



**Carla Cristina Silva
Pereira**

**Nova Abordagem do Diagnóstico Molecular das
Citopatias Mitocondriais**



**Carla Cristina Silva
Pereira**

**Nova Abordagem do Diagnóstico Molecular das
Citopatias Mitocondriais**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Laura Vilarinho, Investigadora Auxiliar do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, CGMJM-INSA e da Professora Doutora Paula Gonçalves, Professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho às famílias afectadas por estas doenças, esperando poder contribuir para a melhoria das suas vidas...

o júri

presidente

Professora Doutora Laura Cristina da Silva Carreto
Investigadora do CESAM & Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Luísa Cristina da Costa Azevedo
Investigadora do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto -
IPATIMUP

Doutora Laura Vilarinho
Investigadora Auxiliar do Departamento de Genética do Centro de Genética Médica Jacinto
Magalhães – CGMJM -INSA

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves
Professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de uma forma directa ou indirecta colaboraram neste trabalho.

Contudo, gostaria de agradecer de uma forma particular:

À Doutora Laura Vilarinho por me ter encaminhado para a área do diagnóstico das Citopatias Mitocondriais há alguns anos atrás, ao longo dos quais me incentivou e motivou a compreender melhor estas doenças e a adquirir novas competências. E igualmente pela orientação deste trabalho, disponibilidade prestada, confiança nas minhas capacidades e autonomia concedida para levar a cabo este estudo.

À Dr.^a Dulce Quelhas e Doutora Lúcia Lacerda por me terem permitido desenvolver este trabalho sem restrições no Serviço de Bioquímica Genética do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães.

À Raquel por ter contribuído para a obtenção dos resultados do estudo genético do genoma mitocondrial ao longo destes anos, tendo assim possibilitado uma avaliação mais abrangente.

Às minhas colegas mas sobretudo Amigas, Carmen, Dorinda, Helena, Fernanda e Laura por me acompanharem através da partilha de alegrias e tristezas, participar nos meus sucessos e compreender as minhas falhas.

Ao grupo restrito mas excelente de Amigos que estão comigo há muito nesta aventura que é a vida.

E finalmente mas especialmente, à minha Mãe por tudo o que ela é, e me permitiu ser, e também ao meu irmão e Tios Teresa e António por terem contribuído para que pudesse concretizar este projecto.

palavras-chave

Citopatias Mitocondriais; Diagnóstico molecular; genes mitocondriais; genes nucleares; algoritmo

resumo

As citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças clinicamente e geneticamente heterogêneas, que resultam de uma diminuição do metabolismo energético devido a um déficit da fosforilação oxidativa de origem genética. A mitocôndria é um organelo citoplasmático presente em todas as células eucariotas, à exceção dos eritrócitos, que tem a particularidade de possuir o seu próprio genoma transmitido pela linha materna. O DNA mitocondrial codifica treze das cerca de 80 subunidades estruturais dos complexos da fosforilação oxidativa, as restantes são codificadas pelo DNA nuclear assim como todas as outras proteínas (~1500) necessárias para a manutenção do mtDNA e função mitocondrial; uma mutação num destes genes poderá causar uma citopatia mitocondrial mesmo que secundária. As citopatias mitocondriais são assim doenças que podem atingir qualquer órgão/tecido, geralmente multissistêmicas, associadas a uma grande variedade de sinais e sintomas, em todas as idades, e associadas a qualquer tipo de hereditariedade. As mutações patogénicas no DNA mitocondrial são mais frequentes nos adultos, estimando-se que apenas sejam responsáveis por 10 à 25 % dos casos pediátricos, em que a alteração genética é maioritariamente de origem nuclear. O diagnóstico das citopatias mitocondriais torna-se então um desafio. Deverá idealmente envolver uma abordagem multidisciplinar incluindo avaliações de âmbito clínico, metabólico, bioquímico, histológico e molecular. O diagnóstico molecular é muitas vezes fundamental para a confirmação de citopatia mitocondrial.

Neste trabalho elaborou-se um algoritmo com guias de orientação para o estudo genético dos genes mitocondriais e nucleares, em sangue e/ou músculo esquelético, de crianças e adultos. A abordagem molecular do genoma mitocondrial evidenciada no algoritmo foi avaliada através do estudo retrospectivo e prospectivo de doentes com suspeita de citopatia mitocondrial. Os resultados obtidos permitiram o diagnóstico molecular em alguns doentes bem como realçar a eficácia de algumas das vias indicadas. Este algoritmo poderá auxiliar os técnicos de saúde no planeamento e racionalização do diagnóstico molecular, tornando-o mais eficaz e rentável, possibilitando a caracterização genética de um maior número de casos, e assim permitir o aconselhamento genético e eventualmente o diagnóstico pré-natal.

keywords

Mitochondrial disorders; Molecular diagnosis; mitochondrial genes; nuclear genes; algorithm

abstract

Mitochondrial disorders are a heterogeneous group of diseases characterized by impaired energy metabolism due to presumed genetically-based oxidative phosphorylation dysfunction. Mitochondria are unique in mammalian cells, being the only subcellular organelles other than the nucleus that contain functional DNA. Mitochondrial DNA encodes 13 protein subunits required for oxidative phosphorylation plus 22 transfer RNAs and two ribosomal RNAs. Another ~80 oxidative phosphorylation subunits plus all other proteins and RNAs needed for mtDNA expression and mitochondrial function are encoded by the nucleus and require import into the mitochondria; mutations in most of these genes can cause human disease. Mitochondrial disorders present as single- or multi-system diseases, with a wide variety of signs and symptoms, at any age, and with all patterns of inheritance. Mutations in mitochondrial DNA are more frequently found in adults, representing 10 to 15% of the genetic cause in children which is mostly of nuclear origin. This complexity presents a challenge for the diagnosis of patients with suspected mitochondrial disease. A multidisciplinary approach should be address including clinical, metabolic, histological, biochemical and molecular studies. Molecular genetics is important, when possible, to confirm the diagnosis.

In this work an algorithm was elaborated for the orientation of the molecular study of mitochondrial or nuclear genome, in blood or muscle, of children and adults. The genetic approach of mitochondrial genome was tested through the retrospective and prospective studies of patients with suspected mitochondrial disorders. The results led to the molecular diagnostic in some patients and emphasize the efficacy of some guidelines. This algorithm should provide guidance on the management of these disorders for all the technicians involved, as well as an increasing number of molecular diagnosis allowing a better prognosis and accurate recurrence risk counseling.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	3
1.1	CITOPATIAS MITOCONDRIAS	3
1.2	MITOCÔNDRIA	6
1.3	DNA E GENÉTICA MITOCONDRIAL.....	8
1.3.1	DNA mitocondrial	8
1.3.2	Genética mitocondrial	11
1.4	MUTAÇÕES PRIMÁRIAS NO DNA MITOCONDRIAL	14
1.4.1	Mutações patogénicas.....	16
1.4.2	Polimorfismos “antigos”	19
1.4.3	Mutações somáticas.....	20
1.5	FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA – OXPHOS	21
1.5.1	Complexo I	23
1.5.2	Complexo II	25
1.5.3	Complexo III	26
1.5.4	Complexo IV	28
1.5.5	Complexo V.....	30
1.6	SÍNDROMES ASSOCIADAS COM MUTAÇÕES NO MTDNA	32
1.6.1	MELAS - Encefalopatia mitocondrial, com acidose láctica e episódios de enfarte like	32
1.6.2	MERRF – Epilepsia mioclónica com RRFs	33
1.6.3	NARP - Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa; MILS - Síndrome de Leigh de hereditariedade materna.	34
1.6.4	LHON – Neuropatia óptica hereditária de Leber.	35
1.6.5	Diabetes mitocondrial; MIDD – Diabetes e surdez de hereditariedade materna.	37
1.6.6	Surdez neurosensorial.....	38
1.6.7	Cardiomiopatia	39
1.6.8	CPEO - Oftalmoplegia externa progressiva crónica; PS - Síndrome de Pearson e KSS - Síndrome de Kearns-Sayre	40
1.7	GENES NUCLEARES E FENÓTIPOS ASSOCIADOS	41
2	OBJECTIVOS	45
3	DOENTES E MÉTODOS.....	49
3.1	DOENTES E AMOSTRAS BIOLÓGICAS	49
3.2	MÉTODOS	52

3.2.1	<i>Extracção de DNA</i>	52
3.2.2	<i>Southern-Blotting</i>	53
3.2.3	<i>Pesquisa de deleções por PCR</i>	56
3.2.4	<i>Sequenciação parcial do mtDNA</i>	57
3.2.5	<i>Sequenciação do mtDNA completo</i>	59
3.2.6	<i>RFLP</i>	61
3.2.7	<i>Bioinformática</i>	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	ALGORITMO	67
4.2	ESTUDO DO DNA MITOCONDRIAL	70
4.2.1	<i>Mutações pontuais patogénicas descritas</i>	70
4.2.2	<i>Mutações com patogenicidade não esclarecida</i>	80
4.2.3	<i>Mutações pontuais não descritas</i>	85
4.2.4	<i>Rearranjos</i>	93
4.2.5	<i>Avaliação da sequenciação do mtDNA completo</i>	94
4.2.6	<i>Avaliação geral dos resultados</i>	96
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	101
6	BIBLIOGRAFIA	105
7	ANEXOS	119
7.1	ANEXO I – GENES NUCLEARES E FENÓTIPOS ASSOCIADOS	119
7.1.1	<i>Genes estruturais e de assembly</i>	119
7.1.2	<i>Genes da replicação e metabolismo do pool dos dNTPs</i>	119
7.1.3	<i>Síndromes de depleção e/ou deleções múltiplas</i>	124
7.2	ANEXO II – SOLUÇÕES PARA SOUTHERN-BLOTTING	128
7.3	ANEXO III – TABELAS DOS GENES NUCLEARES	130

Índice de Figuras

Figura 1 - Sistemas e órgãos atingidos nas CM.....	4
Figura 2 - Diagrama da mitocôndria.	7
Figura 3 - Metabolismo mitocondrial com três das vias essenciais à patofisiologia da doença - OXPHOS; Produção de ROS; Regulação da apoptose.	8
Figura 4 - Genoma mitocondrial humano.....	9
Figura 5 - Maquinaria de replicação do mtDNA.....	11
Figura 6 - O fenómeno de bottleneck mitochondrial.	14
Figura 7 - Representação da molécula do mtDNA com as mutações pontuais mais comuns nos genes dos tRNAs e genes estruturais, e igualmente uma deleção de 5kb.....	15
Figura 8 - tRNA ^{Leu} com todas a mutações descritas indicadas por setas.....	18
Figura 9 - Esquema da OXPHOS – Complexos enzimáticos com indicação dos genes estruturais mitocondriais e respectivo número de genes nucleares estruturais e de <i>assembly</i>	21
Figura 10 - Esquema do metabolismo intermediário mostrando a relação entre as vias do piruvato e dos ácidos gordos com a síntese de ATP.....	23
Figura 11 - Complexo I – Forma e vias de transferência de electrões e protões.....	24
Figura 12 - Estrutura geral do complex II	26
Figura 13 - Estrutura parcial do modelo dimérico do complexo III.	27
Figura 14 - Défices da COX.	30
Figura 15 - Estrutura básica dos domínios da ATP sintase e do “motor” de síntese de ATP.....	31
Figura 16 - Posições das mutações patogénicas no <i>MTATP6</i>	32
Figura 17 - Achados histopatológicos clássicos na miopatia mitochondrial.....	34
Figura 18 - Fotografia característica da CPEO. (A) Ptose bilateral; (B) Limitação na mobilidade ocular em todas as direcções nos dois olhos.	41
Figura 19 - Algoritmo para o estudo molecular das CM.	68
Figura 20 - Sequenciações parciais do gene <i>MTRNR1</i> evidenciando a m.1555A>G e o controlo normal.	72
Figura 21 - RFLP para a m.3243A>G.....	73
Figura 22 - Sequenciações parciais do <i>MTTL1</i> em que estão evidenciadas as mutações m.3243A>G e m.3243A>T bem como o controlo normal.	74
Figura 23 - Sequenciações parciais do <i>MTTL1</i> evidenciando a m.3275C>A e o controlo normal ..	75
Figura 24 - Sequenciação parcial do <i>MTATP6</i> evidenciando a m.9176T>C e o controlo normal; e respectivo RFLP.	75

Figura 25 - Sequenciação parcial do <i>MTTL1</i> evidenciando a m.3302A>G e o controlo normal; e respectivo RFLP.....	76
Figura 26 - Sequenciação parcial do <i>MTTK</i> evidenciando a m.8342G>A e o controlo normal; e respectivo RFLP.	76
Figura 27 - Sequenciações parciais do <i>MTATP6</i> evidenciando a m.8993T>G e o controlo normal; e respectivo RFLP.	77
Figura 28 - Sequenciação parcial do <i>MTATP6</i> evidenciando a m.9185T>C e o controlo normal; e respectivo RFLP.	78
Figura 29 - Sequenciações parciais do <i>MTND3</i> evidenciando a m.10191T>C e o controlo normal.	78
Figura 30 - Sequenciação parcial do <i>MTND4</i> evidenciando a m.11778A>G e o controlo normal; e respectivo RFLP.	79
Figura 31 - Sequenciações parciais do <i>MTND5</i> evidenciando a m.13513G>A e o controlo normal; e respectivo RFLP.	79
Figura 32 - Sequenciação parcial do <i>MTND6</i> evidenciando a m.14484T>C e o controlo normal...	80
Figura 33 - tRNAGln com a m.4363G>A.	82
Figura 34 - Estrutura secundária do 16S rRNA em que estão indicadas as mutações m.1992T>C e m.2251G>A.....	88
Figura 35 - A - Estrutura secundária do tRNACys; B - Estrutura terciária de consenso para os tRNAs mitocondriais.....	89
Figura 36 - Sequenciação parcial do <i>MTND1</i> evidenciando a m.3451T>C e o controlo normal.....	91
Figura 37 - Sequenciações parciais do <i>MTATP6</i> e <i>MTCO3</i> evidenciando as mutações m.8929A>G e m.9325T>C bem como os respectivos normais.	91
Figura 38 - Sequenciação parcial do <i>MTND5</i> evidenciando a m.13289G>C e o controlo normal; e respectivo RFLP.	92
Figura 39 - <i>Southern-blotting</i> evidenciando as bandas correspondentes a moléculas de mtDNA deletadas.....	93
Figura 40 - Fotografia da amplificação do fragmento compreendido entre o nt 7433 e nt 15600 do mtDNA.	93
Figura 41 - OXPHOS com indicação dos genes nucleares estruturais e de <i>assembly</i> em que foram descritas mutações, e os respectivos fenótipos.....	119
Figura 42 - Metabolismo do <i>pool</i> de dNTPs com as enzimas e genes envolvidos.	120
Figura 43 - Gene <i>POLG</i> com as mutações descritas e respectivos fenótipos.....	121

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Doentes com pesquisa de deleções por <i>Southern-Blotting</i>	50
Tabela 2 - Doentes com pesquisa de deleções e sequenciação do mtDNA completo	51
Tabela 3 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a sequenciação parcial do mtDNA.	58
Tabela 4 - Identificação dos RSAs e correspondentes genes do genoma mitocondrial amplificados.	60
Tabela 5 - Sequências dos <i>primers</i> , enzimas de restrição e correspondente padrão de bandas para RFLP.	62
Tabela 6 - Mutações pontuais patogénicas descritas.	71
Tabela 7 - Mutações pontuais com patogenicidade não esclarecida	80
Tabela 8 - Mutações pontuais não descritas	86
Tabela 9 - Mutações detectadas através da sequenciação do mtDNA completo.	95
Tabela 10 - Genes nucleares estruturais com mutações patogénicas descritas e respectivos fenótipos.	130
Tabela 11 - Genes de <i>assembly</i> com mutações patogénicas descritas e respectivos fenótipos... ..	130
Tabela 12 - Genes do metabolismo do <i>pool</i> de dNTPs com mutações patogénicas descritas e respectivos fenótipos.	131

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA - Acetilcoenzima A

AD - *Alzheimer disease* – Doença de Alzheimer

ADP - Adenosina Difosfato

adPEO - PEO de hereditariedade autossômica dominante

AHS - *Alpers-Huttenlocher Syndrome*

ANS - *Ataxia Neuropathy Spectrum*

Apaf -1 - *Apoptotic protease activating factor 1*

arPEO - PEO de hereditariedade autossômica recessiva

ATP - Adenosina Trifosfato

CK - *Creatine Kinase* –Creatina Quinase

CM - Citopatias Mitocondriais

CNS - *Central Nervous System* – Sistema Nervoso Central

CoQH - Coenzima Q reduzida

COXI-III - Subunidades I a III da citocromo c oxidase (complexo IV)

CPEO - *Chronic Progressive External Ophthalmoplegia* – Oftalmoplegia externa progressiva crônica

CRM - Cadeia Respiratória Mitocondrial

CytC - Citocromo C

DFNA - *Deafness, autosomal dominant* - Surdez de transmissão autossômica dominante

DFNB - *Deafness, autosomal recessive* - Surdez de transmissão autossômica recessiva

DGK - *Deoxyguanosine kinase* – Desoxiguanosina quinase

DGUOK - *Deoxyguanosine Kinase gene* – Gene da quinase das desoxiguanosinas

D-loop - *Displacement-loop*

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido desoxirribonucleico

dNK - *deoxyribonucleoside kinase* – Quinase dos desorribonucleosídeos

dNTPs - *Deoxyribonucleotide Triphosphates* - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

FAD - Flavina Adenina dinucleotídeo

FADH2 - Flavina Adenina dinucleotídeo reduzida

FFA - *Free Fatty Acids* – Ácidos gordos livres

GRACILE - *Growth Retardation, Amino aciduria, Cholestasis, Iron overload, Lactic acidosis, and Early death*

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

IMM - *Inner Mitochondrial Membrane* - Membrana interna da mitocôndria

IMS - *Intermembrane Space* – Espaço intermembranar

IOSCA - *Infantile Onset SpinoCerebellar Ataxia* – Ataxia espinocerebelar de atingimento infantil

Kb - quilobases

KSS - *Kearn-Sayre Syndrome*

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LHON - *Leber Hereditary Optic Neuropathy* – Neuropatia óptica hereditária de Leber

LS - *Leigh syndrome*

LSP - *Light Strand Promoter* – Promotor da cadeia leve

MCHS - *Myocerebrohepatopathy Syndrome* – Síndrome miocerebrohepático

MELAS - *Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes* – Encefalopatia mitocondrial, com acidose láctica e episódios de enfarte-like

MEMSA - *Myoclonus Epilepsy Myopathy Sensory Ataxia* - Síndrome de epilepsia mioclónica, miopatia e ataxia sensorial

MERRF - *Mioclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres* - Epilepsia mioclónica com fibras vermelhas e rotas

MIDD - *Maternally Inherited Diabetes and Deafness* - Síndrome de diabetes e surdez de hereditariedade materna

MILS - *Maternally Inherited Leigh Syndrome* – Síndrome de Leigh de hereditariedade materna

MIRAS - *Mitochondrial-associated Recessive Ataxia Syndrome* - Síndrome de ataxia recessiva mitocondrial

MNGIE - *Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy* - Encefalopatia neurogastrointestinal mitocondrial

mRNA - *messenger RNA*– ARN mensageiro

MTATP - símbolo dos genes do complexo V

MTCO - símbolo dos genes que codificam subunidades estruturais do complexo IV

MTCYB - símbolo do gene do citocromo b

mtDNA - *mitochondrial DNA*– ADN mitocondrial

MTND - símbolo dos genes que codificam subunidades estruturais do complexo I

MTRNR1 - símbolo do gene do 12S rRNA

mt-SSB - *mitochondrial single-stranded binding protein* - proteína de ligação de cadeia simples mitocondrial

MTTF - símbolo do gene do tRNA Fenilalanina

MTTI - símbolo do gene do tRNA Ileucina

MTTK - símbolo do gene do tRNA Lisina

MTTL1 - símbolo do gene do tRNA^(UUR)Leu

MTTL2 - símbolo do gene do tRNA^(CUN)Leu

MTTS1 - símbolo do gene do tRNA^(UCN)Ser

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NARP - *Neurogenic muscle weakness, Ataxia e Retinitis Pigmentosa* - Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa

ND1-4 - subunidades de 1 a 4 da NADH desidrogenase (complexo I)

ND4L - subunidade 4L da NADH desidrogenase (complexo I)

ND5-6 - subunidade 5 e 6 da NADH desidrogenase (complexo I)

nDNA - *nuclear DNA* – ADN nuclear

NDPK - *Nucleotide Diphosphate Kinase* - Quinase dos nucleotídeos difosfato

NMPK - *Nucleotide Monophosphate Kinase* – Quinase dos nucleotídeos monofosfato

NNH - *Navajo Neurohepatopathy*

nt - nucleotídeo

O₂ - Molécula de oxigénio

OXPHOS - *Oxidative Phosphorylation* – Fosforilação oxidativa

pb - pares de bases

PD - *Parkinson disease* – Doença de Parkinson

Pi - Fosfato inorgânico

PNS - *Peripheral Nervous System* – Sistema Nervoso Periférico

POLG - Polimerase gamma

POLG2 - Subunidade acessória da POLG

PS - *Pearson Syndrome* – Síndrome de Pearson

RNA - *Ribonucleic Acid* – Ácido ribonucleico

RNR - *Ribonucleotide Reductase* – Redutase dos ribonucleotídeos

ROS - *Reactive Oxygen Species* – Espécies reactivas de oxigénio

RRFs – *Ragged Red Fibers* – Fibras vermelhas e rasgadas

RRM2B - *p53-induced ribonucleotide reductase B subunit gene*

rRNA - *ribosomal RNA* – ARN ribossómico

SANDO - *Sensory Ataxia, Neuropathy, Dysarthria, Ophthalmoparesis* - Síndrome de ataxia sensorial, neuropatia, disartria e oftalmoparésia

SNHL - *Sensorineural Hearing Loss* – Surdez neurosensorial

SOD - Superóxido Dismutase

SSVs - *Strongly Succinate dehydrogenase-reactive blood vessels* - Vasos sanguíneos SDH positivos

SUCLA2 - *ATP-dependant succinyl CoA synthase gene*

SUCLG1 - *GTP-dependant succinyl CoA synthase gene*

TCA - *Tricarboxylic Acid cycle* – Ciclo do ácido tricarboxílico/Ciclo de Krebs

TK - *Thymidine Kinase* - Quinase da timidina

TK2 - *Thymidine Kinase 2 gene*

tRNA - *transfer RNA* – ARN de transferência

tRNA^{Leu} - tRNA Leucina

tRNA^{Ser} - tRNA Serina

TTC19 - tetratricopeptídeo 19

TYMP - *Thymidine Phosphorylase gene*

YBP - *Years Befor Present*

Δ-mtDNA - deleções no DNA mitocondrial

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citopatias mitocondriais

As citopatias mitocondriais (CM) constituem um grupo de doenças clinicamente e geneticamente heterogéneas, que resultam de uma diminuição do metabolismo energético devido a um défice da fosforilação oxidativa (OXPHOS -*Oxidative Phosphorylation*) de origem genética (Haas *et al.* 2008). O conceito de CM foi introduzido em 1962, quando Luft *et al.* publicaram o caso de uma jovem mulher sueca com hipermetabolismo de origem não tiroideia; foi demonstrado um elevado consumo de oxigénio a nível celular, e o estudo histopatológico (músculo esquelético) revelou uma acumulação significativa de mitocôndrias de tamanhos muito variáveis contendo inclusões paracristalinas, tendo a patologia sido atribuída a um défice no controlo da respiração mitocondrial (Luft *et al.* 1962). Nas duas décadas seguintes foram descritos muitos casos de disfunção mitocondrial, e apesar de existirem muitas vias metabólicas na mitocôndria (o complexo da piruvato desidrogenase, o ciclo da carnitina, a beta-oxidação e o ciclo de Krebs), o termo citopatia mitocondrial surge para descrever apenas os défices da OXPHOS (Koenig *et al.* 2008). As CM constituem uma das doenças hereditárias do metabolismo mais comuns, com uma incidência mínima por nascimento estimada em 1: 5,000 - 10,000 (Suomalainen, 2011).

O sistema da OXPHOS, localizado na membrana interna da mitocôndria (IMM - *Inner Mitochondrial Membrane*), inclui a cadeia respiratória mitocondrial (CRM) que envolve quatro dos cinco complexos enzimáticos que o compõem (CI-IV), o complexo V e dois transportadores de electrões, a coenzima Q (ubiquinona) e o citocromo c. Os electrões da NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida) e FADH₂ (Flavina Adenina dinucleotídeo reduzida), que resultam da oxidação da acetilcoenzima A (acetil-CoA) no ciclo de Krebs, são sucessivamente transferidos pelos complexos da CRM através de reacções de redox até ao oxigénio produzindo H₂O, a energia que vai sendo libertada é utilizada pelos complexos I, III e IV para bombear protões através da IMM criando um gradiente electroquímico. A energia potencial armazenada é então utilizada pelo complexo V para converter o ADP (Adenosina Difosfato) e o fosfato inorgânico (Pi) em ATP (Adenosina Trifosfato). A mitocôndria é um organelo citoplasmático presente em todas as células eucariotas, à excepção dos eritrócitos, que tem a particularidade de possuir o seu próprio genoma, o DNA mitocondrial (mtDNA – *mitochondrial Deoxyribonucleic Acid*), cuja transmissão é materna (Johannsen & Ravussin, 2009). O mtDNA codifica treze das cerca de 80 subunidades estruturais dos complexos da OXPHOS, as restantes são codificadas pelo DNA nuclear (nDNA – nuclear DNA) assim como todas as outras proteínas (~1500) necessárias para a manutenção do

mtDNA e função mitocondrial, uma mutação num destes genes poderá resultar numa disfunção da OXPHOS mesmo que secundária. Devido a esta origem bigenómica, a hereditariedade das CM pode ser: materna, autossómica recessiva/dominante, ligada ao X ou esporádica (Kirby & Thorburn, 2008).

Assim, as CM são doenças que podem atingir qualquer órgão ou tecido, em qualquer idade, geralmente multissistémicas, podendo estar limitadas a um só órgão, associadas a uma grande variedade de sinais e sintomas e a qualquer tipo de hereditariedade (Figura1). Tipicamente estas doenças afectarão os órgãos que mais dependem de energia, como o sistema nervoso periférico (PNS -*Peripheral Nervous System*), o sistema nervoso central (CNS – *Central Nervous System*), as glândulas endócrinas e o coração (Finsterer, 2010).

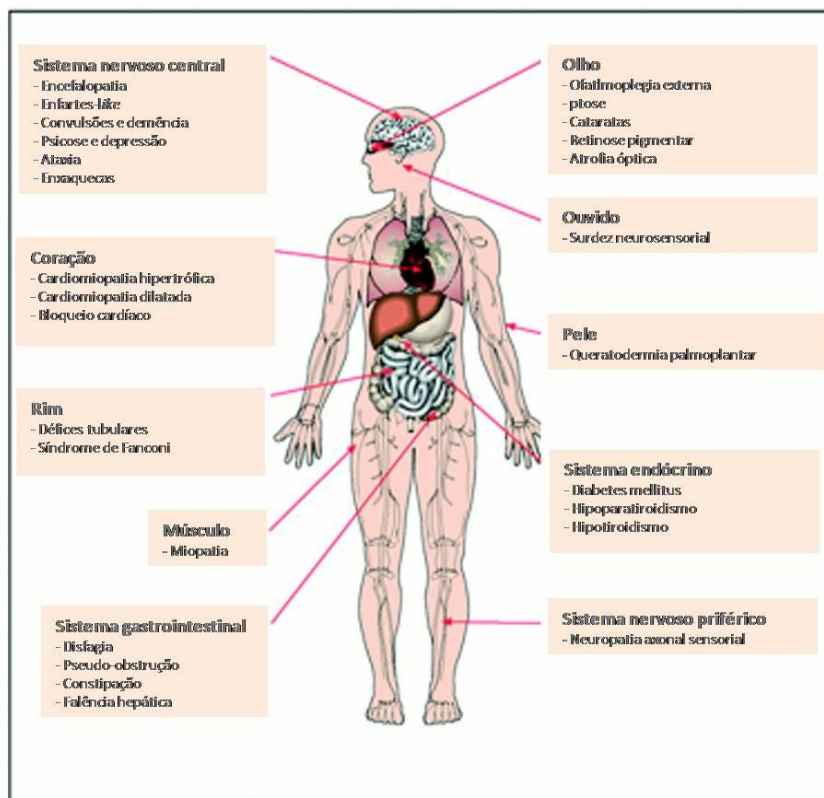


Figura1 – Sistemas e órgãos atingidos nas CM.

(adaptado de Chinnery & Schon, 2003)

Como regra geral, o envolvimento de três órgãos sem um diagnóstico que os relacione deverá levar a suspeita de uma CM (Haas *et al.* 2007). Os sintomas neuromusculares são os mais comuns, e incluem convulsões, fraqueza muscular, intolerância ao exercício, cardiomiopatia, surdez neurosensorial, atrofia óptica, retinite pigmentosa, oftalmoplegia, diabetes mellitus, hipotiroidismo, refluxo gastrointestinal e disfunção renal (Wong, 2010). O envolvimento

multissistémico pode não ser evidente aquando da manifestação inicial e uma apresentação localizada pode progredir lentamente até atingir outros sistemas ao longo do tempo. Um grupo de síndromes clássicas têm sido descritas, para as quais são usados acrónimos (e.g. MELAS - *Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*; MERRF - *Mioclónica Epilepsy with Ragged Red Fibres*), estas estão por vezes associadas a um genótipo específico. Esta associação, no entanto, não é muito concreta nas CM, já que um fenótipo pode estar associado a várias mutações e inversamente, uma mesma mutação pode ser detectada em diferentes fenótipos, constituindo um puzzle para o qual muitas peças estão ainda por esclarecer (McFarland *et al.*, 2009). Foram descritas cerca de 250 mutações patogénicas e rearranjos no mtDNA, e foram identificados 150 genes nucleares nos quais estão a ser detectadas um número crescente de mutações. Normalmente as mutações no mtDNA resultam em doenças com apresentações mais moderadas e tardias, enquanto as alterações no nDNA são mais severas. Estas manifestam-se tipicamente na infância estando estimado que serão responsáveis por 70-80% dos casos, não devendo no entanto desvalorizar-se os muitos exemplos de CM severas devidas a mutações no mtDNA nas crianças (Kisler *et al.* 2010). Apesar das mutações nos genes nucleares terem sido associadas a novas síndromes, algumas alterações causarão fenótipos semelhantes aos das CM primárias fazendo com que muitas vezes a distinção clínica não seja óbvia. As CM têm igualmente sido implicadas no envelhecimento, nas doenças neurodegenerativas (e.g. Doença de Parkinson e Alzheimer) e cancro, entre outros (McFarland *et al.* 2010).

Os factores referidos anteriormente e as particularidades da genética mitocondrial (heteroplasmia, segregação mitótica e limiar de expressão) contribuem assim para a elevada heterogeneidade destas doenças. O diagnóstico das CM é complexo, envolve a avaliação clínica, que levará inicialmente a suspeita, a que se seguirão os estudos metabólicos e de imagem cerebral não invasiva. Mas as análises histológica e bioquímica da OXPHOS em biópsia muscular tornam-se relevantes para sustentar o diagnóstico e poderão permitir a orientação do estudo molecular e a confirmação do diagnóstico. No entanto, a histopatologia do músculo e a avaliação bioquímica da CRM podem revelar-se inespecíficos fazendo com que o diagnóstico molecular assuma um papel fundamental. Este representa mais um desafio devido a heterogeneidade genética destas doenças, mas poderá possibilitar um prognóstico, orientação no tratamento, aconselhamento genético e eventualmente o diagnóstico pré-natal (Lebre, 2010). O tratamento das CM é em grande parte de suporte e sintomático, não revertendo os danos já existentes, a sua eficácia varia de paciente para paciente dependendo do fenótipo e severidade. Várias estratégias estão a ser desenvolvidas interferindo com diferentes vias metabólicas. Poucas foram testadas

em doentes, estando remetidas para experiências a nível celular, tecidual ou em animais, poderão levar 5 a 10 anos a serem avaliadas (Koene & Smeitink, 2009). A investigação mais promissora a nível das CM primárias assenta no desvio da heteroplasmia, no sentido de reduzir o número de células com mtDNA mutado, a nível nuclear a investigação incide na intensificação da biogénese mitocondrial (Schon *et al.* 2010).

1.2 Mitocôndria

O termo mitocôndria foi proposto por Benda em 1898, devido ao seu aspecto filamentoso e cartilágneo, para descrever estes organelos do citoplasma. A sua relevância nas funções metabólicas foi definida na primeira parte do século XX através de uma série de experiências descrevendo o seu envolvimento na OXPHOS (Sproule & Kaufmann, 2008). Segundo a teoria endossimbiótica, hoje amplamente aceite, as mitocôndrias terão resultado da associação simbiótica entre uma célula proto-eucarionte glicolítica e uma bactéria oxidativa, o hospedeiro eucariota forneceu um ambiente seguro e rico em nutrientes e a bactéria cedeu energia. Desta relação permanecem a membrana dupla, o mtDNA, as proteínas mitocondriais que possibilitam a dinâmica deste organelo, o sistema de transportadores de iões, proteínas, bem como as reacções levadas a cabo na OXPHOS (Di Donato, 2009). A maioria dos genes da mitocôndria foi transferida para o nDNA, onde são replicados e transcritos. Os mRNAs (*messenger Ribonucleic Acid*) mitocondriais, codificados pelo nDNA, são traduzidos em proteínas nos ribossomas citosólicos sendo estas posteriormente importadas para a mitocôndria. Esta importação é frequentemente mediada por um sinal N-terminal no peptídeo que é removido aquando da sua entrada na matriz mitocondrial (Wallace, 2005).

As mitocôndrias estão presentes em todas as células eucariotas (a excepção dos eritrócitos), o seu número varia entre 10 a 1000 por célula, podendo ser superior dependendo das necessidades energéticas teciduais, e contêm de duas a dez cópias de moléculas de mtDNA. Foi recentemente estabelecido que não constituem entidades estáticas, movendo-se através da rede do citoesqueleto, estando sujeitas a processos de fusão e fissão. Estes organelos possuem uma membrana externa e outra interna separadas por uma cavidade, o espaço intermembranar (IMS – *Intermembrane Space*). A membrana externa é altamente permeável, contendo numerosos poros para a passagem de pequenas moléculas. Em contraste, a membrana mitocondrial interna é impermeável a maioria das pequenas moléculas e iões, uma propriedade essencial para a criação do gradiente electroquímico. A IMM dobra-se formando vilosidades chamadas cristas aumentando assim a sua área e massa (Figura 2).

Estima-se que três quartos da massa da IMM representem proteínas, sendo muitas delas componentes da OXPHOS, estando o número total de proteínas da mitocôndria estimado em cerca de 1500 (Mao & Holt, 2009)

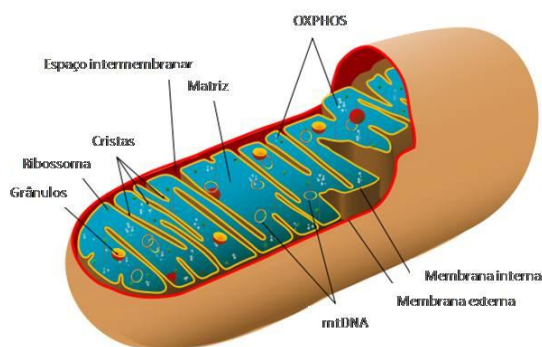


Figura 2 – Diagrama da mitocôndria.

As mitocôndrias desempenham cinco funções nos humanos: 1 – no metabolismo intermediário: a β -oxidação, o ciclo de Krebs, a degradação de aminoácidos, parte da biosíntese do heme, metabolismo dos esteroides e do ciclo do ácido úrico, e o complexo da piruvato desidrogenase; 2 – Produção de ATP – a principal função da mitocôndria é produzir energia sob a forma de ATP na OXPHOS; 3 – Iniciação da apoptose - O citocromo c (CytC) libertado no citosol através da região de transição permeável, liga-se a Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) que por sua vez forma um complexo com a caspase-9 iniciando a cascata da caspase, que termina na morte celular; 4 – Produção de calor – através do desacoplamento da OXPHOS; 5 – Contribuição para a hereditariedade – o mtDNA é herdado pela mãe (Bandyopadhyay & Dutta, 2010). Para além destas funções as mitocôndrias geram e regulam as espécies reactivas de oxigénio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) que contribuem para a patofisiologia das CM (Figura 3). As ROS resultam do desvio dos electrões a nível da CoQH (coenzima Q reduzida) na CRM, estes são directamente transferidos para o O_2 criando o anião superóxido. Este é altamente reactivo, mas pode ser dismutado pela Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD) originando o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que é relativamente estável. No entanto este também poderá ser reduzido originando o radical hidroxilo (OH.) que constitui a ROS mais tóxica. O H_2O_2 também pode ser desintoxicado sendo reduzido a água pela glutathione peroxidase 1 (GPx1) ou convertido a O_2 e H_2O_2 pela catalase. Se não forem neutralizadas as ROS danificam as proteínas mitocondriais, os lípidos e ácidos nucleicos, que inibirão a OXPHOS aumentando a produção de ROS. Quando a mitocôndria se torna deficiente em termos energéticos a ponto de prejudicar o funcionamento celular, as células

terão de ser removidas do tecido. As células com mitocôndrias deficitárias serão então removidas por apoptose através da activação dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mtPTP - *mitochondrial Permeability Transition Pore*). Este complexo detecta as modificações a nível da mitocôndria e abre um canal entre o citosol e a matriz mitocondrial. Isto despolariza o gradiente electroquímico e leva as mitocôndrias a aumentar de volume. As proteínas mitocondriais do IMM são então libertadas para o citosol, entre estas está o CytC, que como vimos anteriormente desencadeará o processo de morte celular (Wallace, 2005).

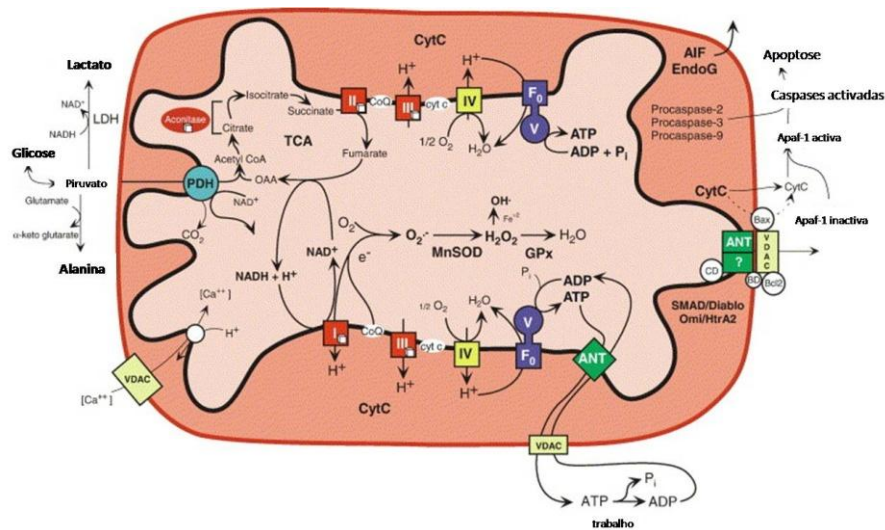


Figura 3 – Metabolismo mitocondrial com três das vias essenciais à patofisiologia da doença - OXPHOS; Produção de ROS; Regulação da apoptose.

(adaptado de Wallace, 2005)

1.3 DNA e genética mitocondrial

1.3.1 DNA mitocondrial

As primeiras descrições do DNA mitocondrial surgiram nos anos 60 (Nass & Nass, 1963a; Nass & Nass, 1963b; Clayton & Vinograd, 1967). A sequência completa deste genoma foi identificada em 1981 e revista em 1999 (Anderson *et al.* 1981; Andrews *et al.* 1999). O mtDNA com 16,569-Kb é uma molécula circular de cadeia dupla, a cadeia leve rica em citosinas (L – *Light strand*) e a cadeia pesada rica em guaninas (H- *Heavy strand*). Codifica 13 das cerca de 80 subunidades proteicas dos complexos da OXPHOS, que incluem os polipeptídeos ND1-4, ND4L, ND5-6 do complexo I, o citocromo b do complexo III, COXI-III do complexo IV, ATP6 e ATP8 do complexo V. Adicionalmente, contém 24 genes necessários a síntese proteica mitocondrial, dois genes dos

rRNAs (12S e 16S) e 22 genes dos tRNAs (transfer RNA), um para cada um dos 20 aminoácidos, possuindo dois genes para o tRNA^{Leu} (codões UUR e CUN) e tRNA^{Ser} (codões UCN e AGY) respectivamente. Os genes dos rRNAs (ribosomal RNA) e de todos os polipeptídeos, excepto o do ND6, estão localizados na cadeia pesada. Os genes dos tRNAs estão intercalados entre os das subunidades proteicas, os transcritos maduros são criados a partir dos transcritos policistrónicos por clivagem dos tRNAs seguida da poliadenilação dos mRNAs (Scaglia & Wong, 2008). O mtDNA possui igualmente uma região não codificante, de ~900 pb, com uma porção de cadeia tripla chamada de D-loop (*Displacement-loop*), cuja função ainda não foi totalmente esclarecida. A síntese da terceira cadeia inicia-se no promotor da cadeia leve (LSP - *Light Strand Promoter*) (Figura 4). De notar, que todas as subunidades do complexo II são codificadas pelo nDNA, bem como as chaperonas e factores de *assembly* que permitem a conjugação das diferentes subunidades proteicas de cada complexo juntamente com os seus grupos prostéticos e centros reactivos (Wong, 2007). Existem centenas a milhares de cópias do genoma mitocondrial numa única célula dependendo das suas necessidades energéticas. As múltiplas (~ 6-10) cópias de mtDNA em cada mitocôndria estão organizadas em macrocomplexos estáveis de DNA-proteína, designados de nucleoides, que estão associados a membrana interna, e podem ser trocados entre mitocôndrias (Tuppen *et al.* 2009). O mtDNA usa um código genético modificado e simplificado, utiliza um codão stop (UGA) como um segundo triptofano e os codões AGG e AGA não codificam um tRNA^{Arg} mas sim codões stop (Wallace, 2005).

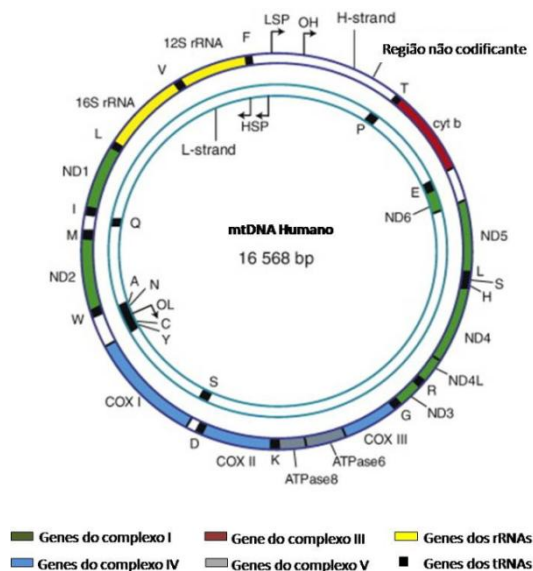


Figura 4 – Genoma mitocondrial humano mostrando a cadeia pesada (*H-strand*) e cadeia leve (*L-strand*) com os respectivos promotores (*LSP* – *Light strand promotor*; *HSP*–*Heavy strand promotor*) e origens de replicação (OL e OH). Os genes das subunidades estruturais estão indicados em função das cores apresentadas e os tRNAs de acordo com o código do respectivo aminoácido.

(adaptado de Wanrooij & Falkenberg, 2010)

O mtDNA replica-se por si só, independentemente do ciclo celular que regula a replicação do DNA nuclear, graças a um conjunto de proteínas que formam o replissoma mitocondrial. Dois mecanismos de replicação foram propostos até à data. No mecanismo assíncrono ou “deslocamento da cadeia”, que constitui o modelo ortodoxo, existem duas origens de replicação separadas espacialmente e temporalmente, uma para cada cadeia do mtDNA. O processo da replicação do mtDNA inicia-se na origem da cadeia pesada (OH-), localizada no *D-loop*, e prossegue na direcção do ponteiro do relógio até dois terços do círculo do mtDNA, onde a origem de replicação da cadeia leve (OL) será exposta (Figura 4). Este facto permite que a síntese na cadeia leve proceda na direcção oposta até a molécula completa ser copiada (Brown *et al.* 2005). Uma série de experiências complexas baseadas na caracterização dos intermediários da replicação do mtDNA *in vivo*, por electroforese de duas dimensões e microscopia electrónica, permitiram a Holt *et al.* propor um modelo alternativo de “cadeia sincronizada” para a replicação do mtDNA. Neste modelo, a replicação é iniciada em múltiplas origens e distribuída ao longo de um fragmento de 4 kb a 3’ do *D-loop*, e procede em ambas as direcções em “bolhas de replicação”. Neste modelo, as cadeias de RNA complementares desempenham um papel fundamental, ainda mal entendido, estas são sintetizadas a partir de uma cadeia simples de DNA e servem possivelmente de *primers* de replicação (Holt *et al.* 2009).

Aquando da associação simbiótica, os genes do mtDNA com funções importantes foram salvaguardados tendo sido transferidos para o nDNA. A replicação do mtDNA bem como a sua transcrição e tradução passaram a estar sob controlo nuclear. Os elementos chave da replicação são a helicase *Twinkle*, que abre a dupla hélice de DNA, a proteína de ligação de cadeia simples mitocondrial (mt-SSB – *mitochondrial Single-stranded Binding protein*), que estabiliza a cadeia, e a polimerase gamma (POLyA) e a sua subunidade acessória – POLyB (Figura 5). A transcrição do mtDNA requer um pequeno número de proteínas que incluem os factores auxiliares de reconhecimento (TFB1M – *Transcription factor B1, Mitochondrial*; TFB2M – *Transcription factor B2, Mitochondrial*), o promotor de activação (TFAM – *Transcription factor A, Mitochondrial*), e o factor de terminação da transcrição (*mTERF* – *mitochondrial Transcription Termination Factor*). A tradução ou síntese proteica envolve os factores de iniciação, elongação e terminação (Koene & Smeitink, 2009).

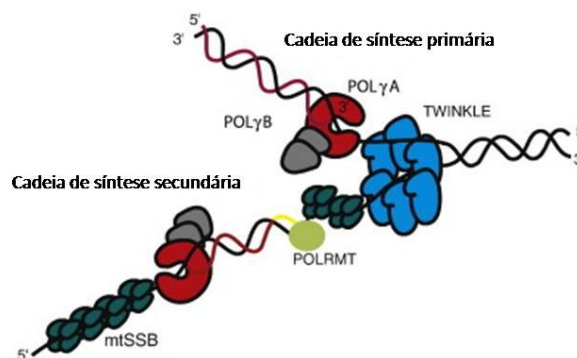


Figura 5 – Maquinaria de replicação do mtDNA. A helicase twinkle move-se de 5' para 3' desdobrando o DNA de cadeia dupla. A proteína mtSSB estabiliza a conformação da cadeia simples e estimula a síntese de DNA pela POLγA e POLγB. A POLRMT (*DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial*) sintetiza o primer do RNA necessário para a cadeia secundária.

(adaptado de Wanrooij & Falkenberg, 2010)

A taxa de mutações no mtDNA é 10 a 17 vezes superior à do nDNA. Outras diferenças incluem o facto de este genoma ser pequeno, circular, ter um número elevado de cópias por célula e ser herdado pela linha materna. A elevada taxa de mutações do mtDNA poderá ser explicada pelo facto deste genoma estar próximo da IMM estando exposto as ROS, estar desprovido de histonas, bem como possuir um mecanismo de reparação ineficaz. Para além disso o mtDNA não possui intrões (apenas 5% da molécula é não codificante), verificando-se nalguns casos a sobreposição de genes (Zifa *et al.* 2007). Um outro factor reside no facto do DNA mitocondrial poder replicar-se mais de uma vez durante o ciclo celular e, durante a replicação, longos segmentos do mtDNA permanecerão em cadeia simples o que poderá acelerar a progressão da polimerase e promover o aparecimento de novas mutações (Montoya *et al.* 2009). A natureza polimórfica do mtDNA, combinada com o seu elevado número de cópias tem sido útil para as áreas da medicina forense, identificação de restos humanos, e nos estudos da evolução humana (Mitchell *et al.* 2006).

1.3.2 Genética mitocondrial

As regras da genética mitocondrial diferem das da genética nuclear, o mtDNA é herdado apenas pela mãe, utilizam-se os conceitos de homoplasmia e heteroplasmia, estes influenciam a penetrância da doença, que dependerá igualmente do limiar de expressão, da segregação mitótica e do fenómeno de *bottleneck*.

1.3.2.1 Homoplasmia, heteroplasmia e limiar de expressão

Estes conceitos são exclusivos da genética mitocondrial e relevantes para o diagnóstico. A homoplasmia corresponde a situação em que todas as cópias de mtDNA são idênticas. Quando

apenas uma proporção das moléculas são afectadas por uma mutação, então coexistem duas espécies de mtDNA, criando uma situação designada por heteroplasmia. Esta é uma das razões pela qual nem todos indivíduos portadores de mutações desenvolvem doença; para a maioria das variantes deverá existir um limiar de moléculas mutadas para que sejam expressas ou seja para que a função mitocondrial esteja comprometida e as consequências clínicas se tornem aparentes – limiar de expressão. Este limiar pode variar entre indivíduos, tecidos e para as diferentes mutações. Isto sugere que devem existir outros factores que influenciam a expressão da doença, estes poderão ser nucleares, ambientais ou relacionados com os haplogrupos mitocondriais (Kishler *et al.* 2010). A maioria das mutações patogénicas são heteroplásmicas, existindo no entanto algumas mutações em homoplasmia responsáveis por determinados fenótipos, mas com uma penetrância variável entre doentes e familiares. Esta questão ainda não está totalmente elucidada mas o seu esclarecimento poderá aumentar a medida que forem detectadas e investigadas. A maioria das mutações heteroplásmicas estão associadas a fenótipos complexos e como vimos a sua gravidade depende geralmente da taxa de mutação, pelo contrário a maioria das mutações homoplásmicas estão restringidas a fenótipos que atingem apenas um órgão.

1.3.2.2 Hereditariedade materna

À excepção de um caso sugestivo de transmissão paterna, o genoma mitocondrial é herdado pela mãe: todos os filhos poderão herdar a doença, mas apenas as filhas correm o risco de a transmitir a sua descendência (Schwartz & Vissing, 2002). A medida que o simbionte mitocondrial foi evoluindo, a pressão selectiva resultou na transmissão uniparental do mtDNA. Nos humanos e nos animais este objectivo é atingido, através da diluição das moléculas de mtDNA do esperma, pelos mtDNAs dos ovários aquando da fertilização; o ovócito contém mais de 200 000 cópias de mtDNA enquanto os espermatozóides apenas centenas. Para além disso, os mtDNAs residuais serão selectivamente removidos nos animais; nos mamíferos, as mitocôndrias do espermatozóide são marcadas com ubiquitina a fim de serem reconhecidas e destruídas pelo ovócito, num período de 24 horas após a fertilização (Wallace, 2007). A transmissão materna de mtDNAs mutados ocorre, mas o risco depende do tipo de mutação e da sua segregação nos tecidos maternos. A investigação de mutações específicas em famílias afectadas poderá facilitar a determinação da probabilidade de transmissão através da linha germinativa. Um estudo realizado sobre as deleções simples de grande tamanho em 226 famílias mostrou que o risco de recorrência para a descendência, quando a mãe é afectada, seria de 4,11% (Chinerri *et al.* 2004). As mutações homoplásmicas são transmitidas a toda a descendência, no entanto o aconselhamento genético dado às famílias não é linear, já que existem alterações em que a penetrância é variável sugerindo

a presença de outros factores, o que acontece na neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON - *Leber Hereditary Optic Neuropathy*) com a mutação m.11778G>A. A transmissão de mutações em heteroplasmia é ainda mais complexa. Existe um fenómeno de *bottleneck* genético durante o desenvolvimento que condicionará a quantidade de mtDNAs mutados transmitidos a descendência. Adicionalmente, a manifestação dos sintomas dependerá da relativa proporção entre moléculas normais e mutadas, e muito provavelmente do genótipo nuclear e factores ambientais (Taylor & Turnbull, 2005).

1.3.2.3 Segregação mitótica

Durante a divisão celular, a replicação do mtDNA e a sua transmissão para as diferentes linhagens e células somáticas é aleatória, resultando muitas vezes na modificação da proporção de moléculas mutadas, durante a vida de um paciente, nos diferentes tecidos e até células. Este fenómeno, chamado de segregação mitótica, explica como certos doentes podem efectivamente transitar de um fenótipo clínico para outro a medida que envelhecem. A segregação pode ocorrer na gametogénese, durante a divisão celular mitótica, e igualmente na tumorigénese. Assim, podemos dizer que um determinado fenótipo clínico é o produto da interacção entre o nível de heteroplasmia e a distribuição dos genomas mutados, tanto no espaço (dentro dos organelos, células, tecidos e órgãos) como no tempo. No entanto, não devemos esquecer que o músculo, o coração e o cérebro devido a sua dependência energética, poderão ter as suas funções comprometidas mesmo com uma taxa de mutação inferior à de outros tecidos. Para além disto, para a maioria das doenças, o fenótipo clínico não é simplesmente uma razão directa da proporção de moléculas mutadas mas envolverá outros factores como o genótipo nuclear, a idade, o sexo, factores ambientais e outros (Zifa *et al.* 2007).

1.3.2.4 Fenómeno de *Bottleneck*

A observação entre gerações de mamíferos, de uma rápida segregação de genótipos em heteroplasmia para genótipos em homoplasmia, sugeriu que existia um fenómeno de *bottleneck* do mtDNA durante o desenvolvimento. O preciso mecanismo pelo qual o *bottleneck* genético ocorre ainda não está totalmente esclarecido e é alvo de muito debate (Tuppen *et al.* 2009). A hipótese prevalente é a de que o *bottleneck* ocorre durante o desenvolvimento embrionário, em que se verifica uma redução marcada no número de cópias de mtDNA na linha germinativa (Jenuth *et al.* 1996). Paradoxalmente, também foi sugerido que o *bottleneck* ocorre sem redução do número de cópias do mtDNA na linha germinativa, mas é o resultado da replicação preferencial de um subgrupo de moléculas de mtDNA durante a oogénese (Cao *et al.* 2007).

Finalmente, uma terceira visão sobre o *bottleneck* genético foi recentemente proposta, e resultou da observação de que variações na heteroplasma e número de cópias do mtDNA ocorrem na oogénese em células germinativas isoladas, sugerindo que o *bottleneck* parece ter lugar durante a foliculogénese pós-natal e não durante a oogénese embrionária, em consequência da replicação de uma subpopulação de genomas mitocondriais (Wai et al, 2008). Será necessária mais investigação para esclarecer a natureza exacta deste fenómeno (Figura 6).

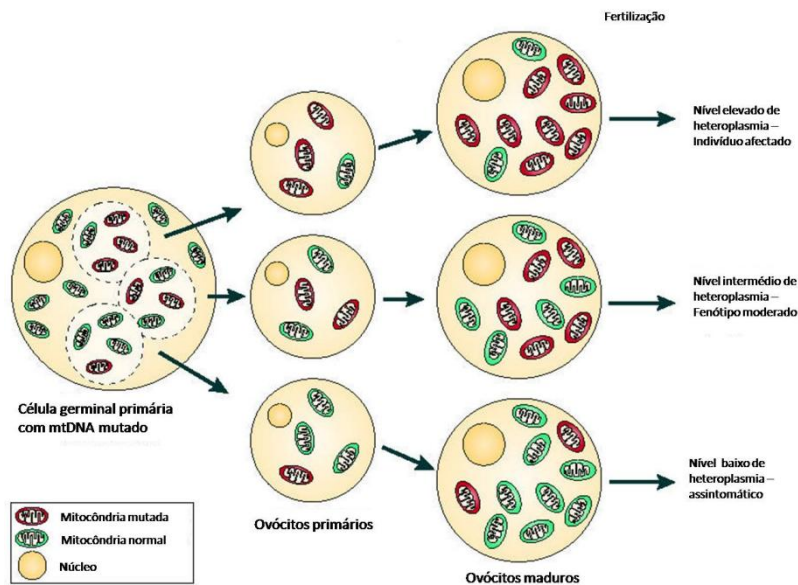


Figura 6 – O fenómeno de bottleneck mitocondrial.

(Adaptado de Taylor & Turnbull, 2005)

1.4 Mutações primárias no DNA mitocondrial.

As primeiras publicações sobre mutações patogénicas no genoma mitocondrial estavam associadas com miopatia e LHON (Holt *et al.* 1988; Wallace *et al.* 1988). Entretanto, cerca de 250 mutações pontuais e rearranjos foram associados com uma grande variedade de citopatias mitocondriais na base de dados MITOMAP (<http://mitomap.org/MITOMAP>). A frequência das mutações no mtDNA está estimada em 1/200-400, mas apenas uma pequena proporção destes indivíduos desenvolverá doença (Finsterer *et al.* 2009; Kisler *et al.* 2010). As mutações no mtDNA compreendem: (1) mutações recentes na linha germinativa materna, que frequentemente resultam em doença; (2) polimorfismos antigos, entre os quais alguns permitiram aos nossos antepassados adaptar-se a novas condições ambientais, e podem constituir factores de predisposição para a doença; e (3) mutações somáticas que acumulam em tecidos pós-mitóticos com a idade (Wallace, 2005). As mutações do primeiro grupo incluem rearranjos ou mutações pontuais nos genes estruturais, dos tRNAs, ou rRNAs (Figura 7). Como vimos anteriormente, nas CM a relação genótipo/fenótipo é relativamente fraca devido as particularidades da genética

mitocondrial, existem no entanto algumas mutações recorrentes em determinadas síndromes. As CM associadas a estas mutações têm geralmente uma apresentação moderada, com uma idade de atingimento mais tardia, apesar de existirem fenótipos severos nas crianças (Wong & Boles, 2005). As mutações mitocondriais mais comuns estão associadas às síndromes: LHON, MELAS, MERRF e a neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa (NARP - *Neurogenic muscle weakness, Ataxia e Retinitis Pigmentosa*). As mutações localizadas num mesmo gene não resultam necessariamente no mesmo fenótipo (e.g., as mutações no *MTND1* podem estar associadas com LHON ou MELAS); e até a mesma mutação pode causar diferentes fenótipos, por exemplo, no gene *MTTL1* considerado um *hotspot*, a mutação mt.3243A>G, não só está associada com a MELAS mas igualmente com a surdez neurosensorial, a diabetes, e a oftalmoplegia externa progressiva crónica (CPEO - *Chronic Progressive External Ophthalmoplegia*), entre outros. Os rearranjos, mais especificamente as deleções, podem também estar associadas a vários fenótipos. E inversamente um fenótipo pode estar relacionado com diferentes mutações localizadas em diversos genes, a MELAS pode ser causada por mais de 20 mutações (Kirby & Thorburn, 2008).

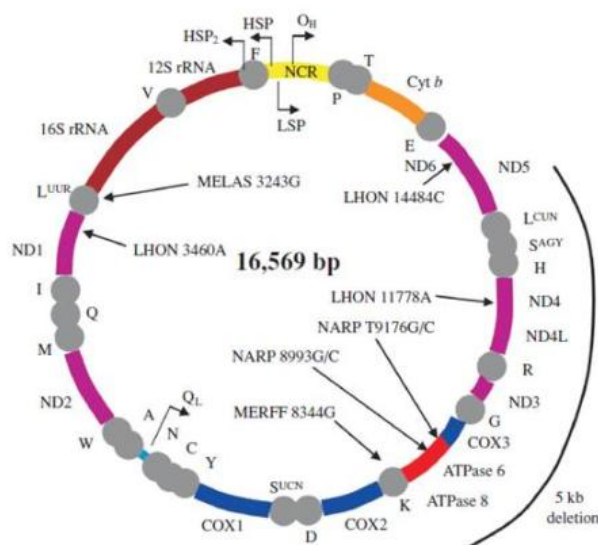


Figura 7 – Representação da molécula do mtDNA com as mutações pontuais mais comuns nos genes dos tRNAs e genes estruturais, e igualmente uma deleção de 5kb.

(Adaptada de Mao & Holt, 2009)

1.4.1 Mutações patogénicas

1.4.1.1 Mutações pontuais

Mais de metade das mutações localizam-se nos genes dos tRNAs, que constituem 9% de todo o genoma mitocondrial. Assim estes genes são considerados *hotspots* para a patogénese mitocondrial e contribuem de uma forma desproporcionada para a etiologia das doenças associadas a mutações no mtDNA, o que é compreensível tendo em conta o seu papel na síntese proteica. Em comparação, um pouco menos de 50% das mutações afectam os genes mitocondriais que codificam as subunidades estruturais dos complexos da OXPHOS, e representam 68% do genoma mitocondrial (Scaglia & Wong, 2008). Dada a elevada taxa de mutação do genoma mitocondrial e a presença de numerosos polimorfismos, a distinção entre uma variante neutra e patogénica torna-se frequentemente difícil. As mutações pontuais patogénicas são geralmente heteroplásmicas, dando origem a uma variedade clínica considerável, no entanto um número crescente de mutações patogénicas em homoplasmia, afectando apenas um órgão e caracterizadas por uma penetrância incompleta têm sido identificadas (Tuppen *et al.* 2009). As mutações recorrentes nas síndromes são as mais frequentemente detectadas. Por exemplo, as mutações m.3243A>G (no gene *MTTL1*) e m.8344A>G (no gene *MTTK*) são pelo menos duas vezes tão prevalentes quanto todas as outras mutações conhecidas que causam CM que envolvem o CNS. Adicionalmente, apenas cerca de metade das mutações nos genes MT-ND e MT-ATP têm sido descritas em mais que um *pedigree*, e praticamente todas as mutações no *MTCYB* e genes MT-CO foram detectadas num único paciente ou família (Montoya *et al.* 2009). As mutações pontuais são usualmente de hereditariedade materna, com os indivíduos do sexo masculino e feminino igualmente afectados, mas também poderão ser esporádicas.

- Genes estruturais

A maioria das mutações nos genes que codificam subunidades estruturais dos complexos da OXPHOS ocorre nos genes MT-ND, em parte, devido ao seu número e tamanho representando cerca de 38% do genoma mitocondrial (Wong, 2007). Foram descritas mutações nos sete genes mitocondriais que codificam polipeptídeos do complexo I. As apresentações clínicas mais comuns incluem a síndrome de LHON, a síndrome de Leigh de hereditariedade materna (MILS – *Maternally Inherited Leigh Syndrome*), a MELAS e a sobreposição de MELAS/LHON (Vizarra *et al.* 2009). Em geral, os fenótipos dos doentes com mutações no citocromo b (única subunidade do complexo III codificada pelo mtDNA) são relativamente semelhantes contrastando com a heterogenidade clínica associada com variações nos complexos I e IV. Aproximadamente 60% dos

doentes com mutações no citocromo b têm intolerância ao exercício, 30% apresentam sintomas multissistémicos para além da encefalopatia e miopatia, e 10% têm cardiomiopatia hipertrófica. Cerca de metade das mutações são *nonsense* produzindo proteínas truncadas, as restantes são mutações *missense* e modificam resíduos de aminoácidos muito conservados (Wong, 2007). As mutações patogénicas nos três genes mitocondriais do complexo IV estão associadas a vários fenótipos, essencialmente neurológicos, mas um pequeno número de crianças com encefalopatia apresentavam também cardiomiopatia hipertrófica. Na subunidade I foram reportados casos com anemia sideroblática adquirida e na subunidade III doentes com a síndrome de Leigh. Esta síndrome é a apresentação mais prevalente nos doentes com mutações nas subunidades do complexo V. A variação mais frequente é a m.8993T>G no gene *MTATP6*, que dependendo da taxa de mutação, pode ser assintomática, causar retinopatia com 60-75%, NARP com 75-90% e a síndrome de Leigh com um nível de heteroplasmia superior a 90% (Di Donato, 2009). No gene *MTATP8* estão apenas descritas duas mutações patogénicas, uma foi reportada recentemente (Mkaouar-Rebai *et al.* 2010).

- Genes dos tRNAs ou rRNAs

Os genes dos 22 tRNAs e 2 rRNAs são todos necessários para a tradução mitocondrial, uma mutação em qualquer um deles pode afectar a produção das 13 subunidades proteicas dos complexos da OXPHOS (Mao *et al.* 2009). As primeiras mutações nos genes dos tRNAs a serem descritas foram a m. 8344A>G no *MTTK* e a m.3243A>G no *MTTL1* (Shoffner *et al.* 1990; Goto *et al.* 1990). Estes genes são agora considerados *hotspots* para a ocorrência de mutações no mtDNA. Aproximadamente metade das 250 mutações descritas até à data estão localizadas nos genes dos tRNAs. Todos os tRNAs estão afectados em pelo menos uma posição, sendo o *MTTL1* o mais representativo com 23 diferentes mutações (Figura 8), seguido pelo *MTTK* e *MTTI* com 15 e 14 mutações respectivamente. As células com mutações nos genes dos tRNAs exibem geralmente uma diminuição na respiração. Isto deve-se ao facto de estas mutações poderem afectar a síntese das subunidades dos complexos da OXPHOS. As diferentes mutações produzem uma variedade de défices que incluem, uma diminuição na aminoacilação, uma redução na meia-vida do tRNA, um défice no processamento dos pré-tRNAs, um decréscimo nos níveis de *steady-state* dos tRNAs, entre outros, contribuindo assim para um défice da síntese proteica. No entanto por vezes, os estudos funcionais realizados em culturas celulares não permitem detectar um défice a nível da síntese proteica global. Isto pode ser particularmente problemático quando se investigam mutações homoplásmicas patogénicas com penetrância incompleta (Moreno-Loshuertos *et al.*

2011). A maioria das mutações são transições e estão distribuídas uniformemente ao longo do “corpo” dos tRNAs, nos *stems* e *loops*. As que afetam as regiões do *stem* convertem os pares de bases canônicos de *Watson-Crick* em *mismatches*, essencialmente C>A ou G>U. As mutações no tripleto do anticodão estão praticamente ausentes, com apenas três exceções, o polimorfismo m.12298T>C no *MTTL1* e, as mutações patogênicas m.15990G>A e m.611G>A no *MTTF*. Apesar de a leucina ser o aminoácido mais usado nas mitocôndrias (16%), o codão UUR é menos frequentemente utilizado que o codão CUN (12% versus 88%, respectivamente). As mutações no tRNA^{Leu(UUR)} podem assim ser menos propícias a serem fatais e mais usualmente detectadas. As síndromes causadas por mutações nos tRNAs mais importantes são: a MELAS, MERRF, MILS, LHON, síndrome de Kearn-Sayre (KSS – *Kearn Sayre Syndrome*), surdez neurosensorial síndrômica, ou síndrome de diabetes de hereditariedade materna e surdez (MIDD – *Maternally Inherited Diabetes and Deafness*). As patologias associadas a mutações nestes genes aparecem na infância ou adolescência, nos adultos até a meia-idade, e são mais frequentemente observadas em doentes oligossintomáticos (Zifa *et al.* 2007).

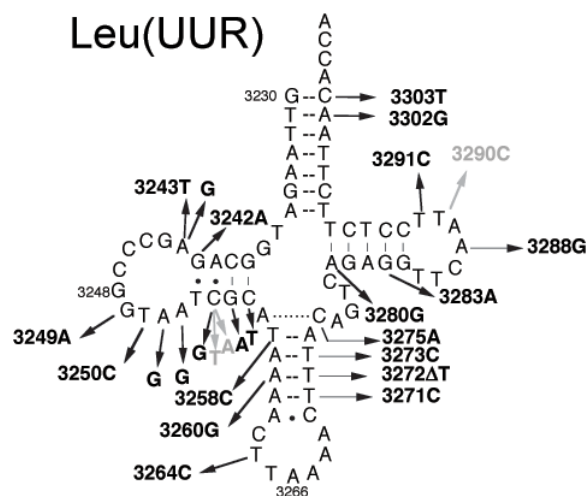


Figura 8 – tRNA^{Leu} com todas as mutações descritas indicadas por setas.

As mutações mais conhecidas nos genes dos rRNAs são a m.1555A>G e a m.1095T>C no gene do 12S rRNA (Prezant *et al.* 1993; Thyagarajan *et al.* 2000). A m.1555A>G está associada com a surdez neurosensorial não síndrômica induzida por aminoglicosídeos. Foi provado que o novo pb G-C, criado pela mutação, facilita a ligação dos antibióticos aminoglicosídeos ao 12S rRNA, o que explica a patofisiologia da surdez induzida (Boles & Friedlich, 2010). Não foi ainda descrita nenhuma mutação na base de dados MITOMAP no gene 16S rRNA.

1.4.1.2 Rearranjos

As primeiras mutações a serem descritas no mtDNA, associadas com doença, eram deleções simples de grande tamanho (Holt *et al.* 1988). Posteriormente foram descritas deleções múltiplas em casos familiares, tendo sido sugerido que eram o resultado de mutações em genes nucleares envolvidos na comunicação intergenómica, o que veio a ser confirmado, podendo no entanto estar relacionadas com o envelhecimento (Zeviani *et al.* 1989; Nishino *et al.* 1999). Alguns doentes têm duplicações para além das deleções. Estes rearranjos (Δ -mtDNA) podem variar de cerca de 1 a 8 kb, e são na sua maioria esporádicos, sempre heteroplásmicos, resultando sempre na perda de um ou mais tRNAs, podendo comprometer a tradução dos genes das 13 subunidades proteicas da OXPHOS. As deleções do mtDNA são detectadas no músculo, no sangue apenas é possível na síndrome de Pearson (PS – *Pearson Syndrome*). Existe uma deleção comum, de 4,977 pb, e verifica-se frequentemente que as deleções apresentam sequências de repetição nos seus pontos de quebra, sugerindo que o mecanismo responsável poderá ser o “*slipped mispairing*” ou uma recombinação homóloga. As apresentações são muito variáveis podendo aparecer em qualquer idade. As deleções simples de grande tamanho estão tipicamente associadas a CPEO, KSS, e PS que constitui o fenótipo mais grave, um terço dos doentes com estas CM apresentam a deleção comum (Yamashita *et al.* 2008).

1.4.2 Polimorfismos

Devido a sua hereditariedade exclusivamente materna as moléculas de mtDNA evoluíram através da acumulação sequencial de mutações nos diferentes ramos das linhagens maternas. Se uma mutação ocorria e era benéfica para um determinado ambiente, a sua frequência aumentava nesse ambiente. Este fenómeno gerou um grupo relacionado de haplotipos de mtDNA (haplogrupo) que se concentraram numa região geográfica específica. Uma das correlações geográficas mais marcantes com haplogrupos de mtDNA é a latitude e consequentemente o clima. Este facto sugere que algumas variantes funcionais que alteram a eficiência de acoplamento mitocondrial podem ter sido favoráveis já que permitiram desviar a produção de ATP para a produção de calor permitindo assim aos humanos sobreviverem nos climas frios do norte (e.g., o gene *MTATP6* é muito variável no ártico mas muito conservado nos trópicos). Actualmente, os haplogrupos de mtDNA continuam a estar relacionados com a distribuição geográfica. Dois terços a três quartos dos mtDNAs Africanos pertencem ao haplogrupo L (Wallace, 2010). Os mtDNAs Africanos estão agrupados em quatro haplogrupos Major: L0 (o mais antigo), L1, L2 e L3 (o mais recente). Os haplogrupos L0, L1 e L2 representam cerca de 76% de todos os

mtDNAs Africanos Subsarianos e são definidos pelo nt-3594T (C). O haplogrupo L3 do norte de África deu origem há 65000 YBP (*Years Before Present*) aos haplogrupos M (Ásia) e N (Europa - 40000/50000 YBP) da eurásia (Wallace, 2007). Na Europa, a linhagem N deu origem a haplogrupos específicos denominados, H, I, J, K, T, U, V, W, e X. Na Ásia os haplogrupos M e N ramificaram-se criando uma plethora de linhagens asiáticas específicas que incluem, a A, B, e F a partir do haplogrupo N, e a C, D e G do M. Entre todas as linhagens de mtDNA asiáticas, apenas a A, C, e D ocuparam com sucesso a região nordeste da Sibéria, de onde partiram os primeiros indivíduos que colonizaram as Américas há cerca de 20000 YBP. Outra vaga de migração através do ártico levou o haplogrupo Europeu X para as regiões dos grandes lagos da América do Norte há 15000 YBP. Posteriormente há 12-15000 YBP, uma migração pela costa resultou na junção do haplogrupo B com o A, C, e D a sul da América do Sul, depois na América Central, e finalmente a norte da América do Sul (Wallace, 1999).

1.4.3 Mutações somáticas

As mutações somáticas no mtDNA podem ser pontuais ou deleções de pequeno ou grande tamanho. Podem ser originadas por três factores: primeiro, por ineficácia da polimerase γ ; segundo, devido à exposição às ROS, realçando que os níveis dos danos oxidativos no cérebro são superiores, particularmente nos idosos; e finalmente, embora as mitocôndrias não possuam mecanismos de reparação por excisão de nucleotídeos estarão protegidas por outros mecanismos de reparação, tendo sido observado que estes diminuem com a idade (Clark *et al.* 2011). Tem sido verificado que tecidos como os do músculo esquelético, coração e cérebro, acumulam níveis relativamente altos de mtDNAs mutados durante o processo de envelhecimento. Muitas destas mutações são detectáveis a partir de metade da terceira década de vida e acumulam com a idade nos tecidos pós-mitóticos. A ocorrência de deleções no mtDNA do músculo esquelético também tem sido relacionada com défices da OXPHOS que surgem com a idade. Apesar do mecanismo responsável pela formação das deleções ainda não estar completamente esclarecido, pensa-se que poderá estar associado a quebra das cadeias simples ou duplas de DNA provocados pelos danos oxidativos. Estes processos também poderão estar envolvidos na génese das mutações somáticas associadas a doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (PD – *Parkinson disease*) e Alzheimer (AD – *Alzheimer disease*). No entanto a correlação entre a ocorrência de mutações no genoma mitocondrial e o envelhecimento necessita de mais investigação para ser compreendida. As mutações somáticas também têm sido detectadas numa variedade de tumores sólidos, como o cancro da próstata, mama, cólon, cabeça e do pescoço. Pensa-se que estas

mutações poderão potenciar as metástases das células cancerosas e levar a um desvio da OXPHOS para a glicólise evitando assim a apoptose destas células (Lee *et al.* 2010). Uma análise alargada das mutações somáticas encontradas nos cancros revelaram que um grande número destas alterações correspondiam a variantes consideradas como polimorfismos nos estudos populacionais, assim as mutações nos cancros poderão ser consideradas adaptativas (Wallace, 2007).

1.5 Fosforilação Oxidativa – OXPHOS

Como vimos anteriormente, a mitocôndria gere a maioria da energia utilizada pelas células, sob a forma de calor ou ATP. A produção de ATP deriva da oxidação de substratos, essencialmente hidratos de carbono e gorduras. Apesar de algum ATP ser sintetizado no citoplasma, este é maioritariamente produzido sob condições aeróbias dentro da mitocôndria, num sistema denominado por fosforilação oxidativa. Este sistema consiste em dois processos: (i) a cadeia respiratória mitocondrial, esta a partir da energia química armazenada nos alimentos que ingerimos cria um gradiente termodinâmico conduzindo a síntese de ATP e (ii) a maquinaria de síntese de ATP em si, que por combinação do ADP com o fosfato inorgânico cria ATP posteriormente exportado para todos os componentes celulares (Schon *et al.* 2010). A OXPHOS requiere a acção orquestrada de cinco complexos enzimáticos com múltiplas subunidades proteicas (no total ~85), os complexos I-IV (CRM) e o complexo V, bem como dois transportadores de electrões (ubiquinona e citocromo c), localizados na IMM. São também necessários uma série de co-factores que incluem flavinas, nicotinamidas, citocromos, centros ferro-sulfureto e iões cobre. A fosforilação oxidativa constitui o único sistema celular dependente de genes mitocondriais e nucleares. O mtDNA codifica 13 das subunidades proteicas dos complexos da OXPHOS (complexos I, III, IV e V), as restantes bem como os polipeptídeos estruturais do complexo II são codificados pelo nDNA (Figura 9).

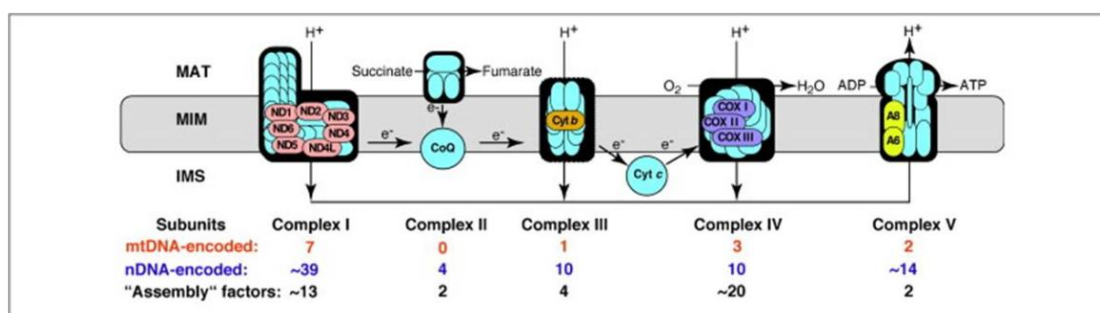


Figura 9 – Esquema da OXPHOS – Complexos enzimáticos com indicação dos genes estruturais mitocondriais e respectivo número de genes nucleares estruturais e de *assembly*.

(Adaptado de Schon *et al.* 2010)

Como foi referido inicialmente, a produção de energia depende da disponibilidade de equivalentes reduzidos consumidos sob a forma de hidratos de carbono e gordura. Os hidratos de carbono são metabolizados pela via glicolítica tendo como produto final o piruvato, as gorduras por sua vez são hidrolizadas. O piruvato é então oxidado pelo complexo da Piruvato Desidrogenase (PDH) em acetilcoenzima A, esta entra no ciclo do ácido tricarboxílico – ciclo de Krebs (TCA-*Tricarboxylic Acid cycle*). Os ácidos gordos livres (FFA - *Free Fatty Acids*) entram na mitocôndria pela via do complexo da Carnitina Palmitoiltransferase I e II, onde através da β -oxidação produzem acetil-CoA. Os iões hidrogénio obtidos através do TCA ou da β -oxidação são então transferidos para a NAD^+ (Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo), originando $\text{NADH} + \text{H}^+$ ou para a Flavina-Adenina Dinucleotídeo (FAD) pelo succinato produzindo FADH_2 (Finsterer, 2010). Os electrões (equivalentes reduzidos do hidrogénio) passam da NADH para o complexo I (NADH Desidrogenase) e da FADH_2 para o complexo II (Succinato Desidrogenase) para então reduzir a ubiquinona ou coenzima Q (CoQ) a ubiquinol (CoQ_2). Alguns equivalentes reduzidos da oxidação dos ácidos orgânicos são transferidos por outros complexos enzimáticos, contendo flavina, directamente para a CoQ . Os electrões da CoQ_2 passam então sucessivamente para o complexo III (complexo bc_1), citocromo c, complexo IV (Citocromo c Oxidase, COX), e finalmente são doados ao oxigénio ($1/2 \text{O}_2$) originando H_2O (Wallace & Fan, 2010). O fluxo de electrões ao longo da CRM liberta energia, que é utilizada pelos complexos I, III e IV para bombear protões através da IMM. É então criado um gradiente electroquímico de protões ($\Delta P = \Delta \psi + \Delta \mu^{\text{H}^+}$) que é ácido e positivo no espaço intermembranar, e alcalino e negativo na matriz. A energia potencial armazenada em ΔP pode ser utilizada para importar proteínas, e Ca^{2+} para a mitocôndria, para criar calor, e sintetizar ATP na matriz mitocondrial (Figura 10). A síntese de ATP ocorre aquando do fluxo de protões do espaço intermembranar para a matriz através da ATP sintase (complexo V). O ATP da matriz é posteriormente trocado pelo ADP do citosol pelos translocadores do nucleotídeo adenina (ANTs) presentes na membrana interna (Johannsen & Ravussin, 2009).

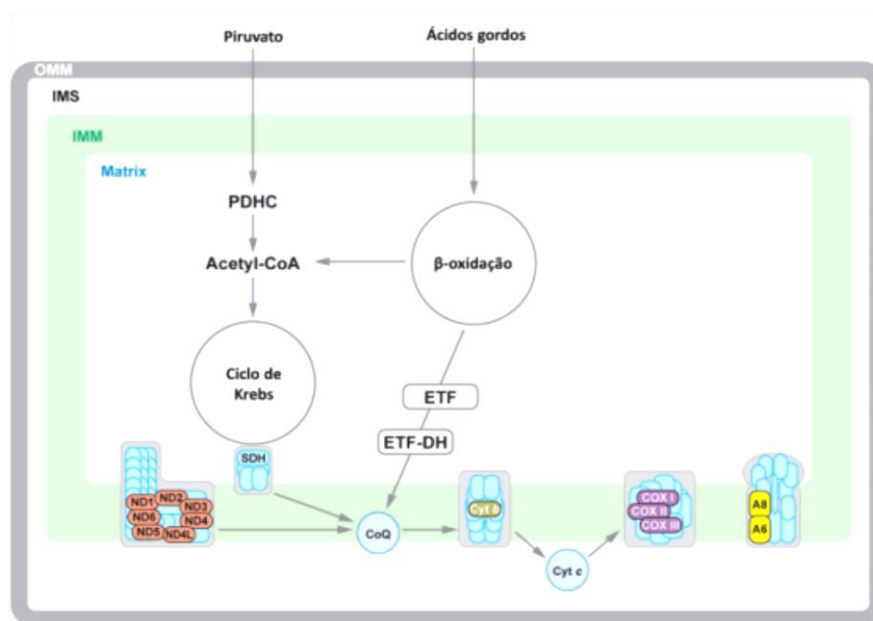


Figura 10 – Esquema do metabolismo intermediário mostrando a relação entre as vias do piruvato e dos ácidos gordos com a síntese de ATP.

(adaptado de DiMauro & Schon, 2008)

1.5.1 Complexo I

O complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) é o principal ponto de entrada de electrões na OXPHOS, cataliza a transferência de dois electrões da NADH para a ubiquinona, estando esta associada à translocação de quatro protões através da membrana mitocondrial, contribuindo assim para o gradiente necessário a síntese de ATP. É o maior complexo da OXPHOS, com uma massa de aproximadamente 980 kDa, consiste em 46 componentes estruturais, um grupo de flavina mononucleotídeo (FMN) e oito centros de ferro-enxofre (Fe-S). Das 46 subunidades constituintes, sete são codificadas pelo mtDNA e as restantes 39 pelo nDNA. O centro catalítico é constituído por 14 subunidades conservadas desde a bactéria até ao homem, sete são nucleares (NDUFS1-3, NDUFS7-8, NDUFV1-2) representando o domínio periférico com os centros redox, e sete são mitocondriais (ND1-6, ND4-L) formando o domínio membranar. Sete outros genes nucleares, *NDUFA1*, *NDUFA2*, *NDUFA8*, *NDUFA10*, *NDUFA11*, *NDUFS6* e *NDUFS4* codificam subunidades acessórias. A principal função das subunidades conservadas do centro catalítico reside na transferência de electrões e translocação de protões, o papel das restantes subunidades está menos esclarecido. Algumas foram implicadas no *assembly*, as restantes estarão envolvidas na regulação do complexo, na prevenção de produção de ROS e protecção contra danos oxidativos (Papa *et al.* 2009).

Devido a sua complexidade e a indisponibilidade de estruturas cristalográficas a três dimensões (3D) de alta resolução ainda há muito por esclarecer acerca dos mecanismos envolvidos no

funcionamento enzimático do complexo I. No entanto, através de estruturas 3D de baixa resolução obtidas por microscopia electrónica, é geralmente aceite que este complexo apresenta uma forma em L (Figura 11), com dois braços perpendiculares: um hidrofóbico embebido na membrana lipídica e um periférico hidrofílico parcialmente projectado na matriz mitocondrial (Janssen *et al.* 2006). Esta demonstração foi verificada na bactéria *Escherichia coli* (Guenebaut *et al.* 1998), nos fungos *Neurospora crassa* (Hofhaus *et al.* 1991), e *Yarrowia lipolytica* (Djafarzadeh *et al.* 2000), e nas mitocôndrias do coração de bovinos (Grigorieff, 1998). De notar que o complexo I está ausente no fungo *Saccharomyces cerevisiae*, impossibilitando a sua utilização como modelo e tornando mais difícil a sua investigação.

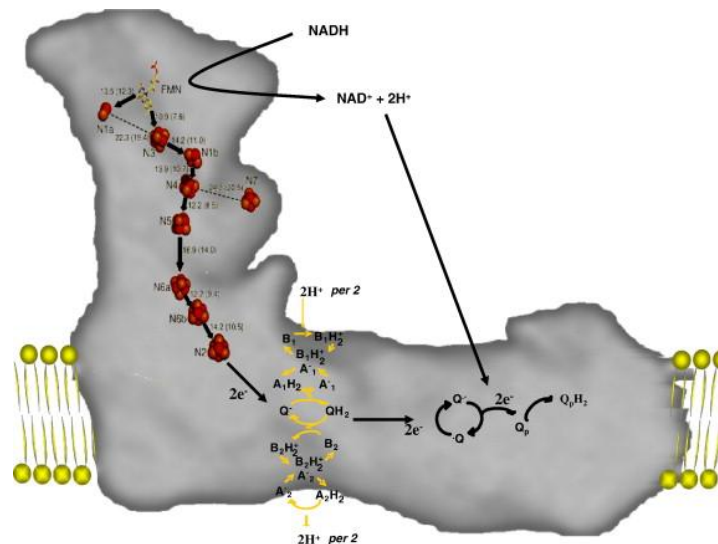


Figura 11 – Complexo I – Forma e vias de transferência de electrões e prótons.

(adaptado de Papa *et al.* 2009)

O *assembly* do complexo I é um processo extremamente complexo, a maioria da informação foi obtida através da investigação em mutantes do fungo *Neurospora Crassa*, cujo complexo I é constituído por 35 subunidades, mas muitos passos continuam por elucidar. No homem foram identificados seis genes de *assembly* cujas funções ainda não estão totalmente esclarecidas, *NDUFAF1*, *NDUFAF2*, *NDUFAF3*, *NDUFAF4*, *C20orf7* e *C8orf38* (Diaz e tal. 2011).

O défice isolado do complexo I é o défice mais comum da CRM representando um terço dos défices bioquímicos da OXPHOS diagnosticados, sendo essencialmente observado no período neonatal, infância e início da adolescência. Os cinco fenótipos mais frequentemente associados são: Síndrome de Leigh (LS – *Leigh syndrome*), encefalocardiomiopatia, acidose láctica neonatal

severa, hepatopatia-tubulopatia e leucodistrofia com macrocefalia, sendo a LS a apresentação mais comum (Berrisford & Sazanov, 2009).

Apesar de já terem sido detectadas mutações nos sete genes estruturais do mtDNA, em 14 genes nucleares estruturais (NDUFS1-4, NFUFS6-8, NDUFA1-2, NDUFA8, NDUFA10-11, NDUFV1-2) e nos seis genes de assembly, muitos défices do complexo I continuam por explicar, podendo vir a ser esclarecidos a medida que o conhecimento sobre as funções dos componentes estruturais e respectivos genes for aumentando. As mutações nos genes mitocondriais serão responsáveis por cerca de 25% dos casos e os fenótipos apresentados incluem LHON, MELAS, NARP/MILS e outras síndromes sobrepostas, entre outros (Tuppen *et al.* 2010)

1.5.2 Complexo II

O complexo II (succinato: ubiquinona oxidoreductase – SQR) também conhecido como succinato desidrogenase (SDH) é o mais pequeno de todos os complexos da OXPHOS, mas desempenha um papel fundamental no metabolismo mitocondrial pertencendo a CRM e ao ciclo de Krebs. A SQR associa a oxidação do succinato em fumarato na matriz mitocondrial à redução da ubiquinona em ubiquinol na membrana interna (Lancaster *et al.* 2002). O complexo II distingue-se dos outros complexos da OXPHOS porque as quatro subunidades que o compõem são todas codificadas pelo nDNA, para além de não participar no bombeamento de prótons através da membrana interna.

É constituído por um largo domínio solúvel localizado na matriz mitocondrial, altamente conservado entre espécies, e um domínio ancorado à membrana com muito maior variabilidade entre organismos (Tornroth *et al.* 2002). A succinato desidrogenase é formada por duas subunidades que representam o centro catalítico contendo co-factores que participam na transferência de electrões para a ubiquinona. A maior subunidade é uma flavoproteína (Fp; SDHA) com o co-factor FAD ligado covalentemente e contendo o sítio de ligação ao succinato, a outra proteína (Ip; SDHB) possui três centros Fe-S que concertam a transferência de electrões. Os centros Fe-S consistem num grupo [2Fe-2S] próximo da FAD, adjacente ao centro [4Fe-4S] e seguido pelo [3Fe-4S]. A SDHB forma igualmente a interface entre o domínio catalítico e o membranal (Figura 12). A succinato desidrogenase está ancorada à membrana pelas subunidades C (CybL) e D (CybS) que incluem um grupo heme e o sítio de ligação a ubiquinona (Rutter *et al.* 2010). Para além das quatro subunidades estruturais um número indeterminado de genes deverá estar envolvido no *assembly* do complexo II, tendo recentemente sido descritos dois factores que participam directa e especificamente nesta função: o SDHAF1 e o SDHAF2 (Ghezzi *et al.* 2009; Hao *et al.* 2009).

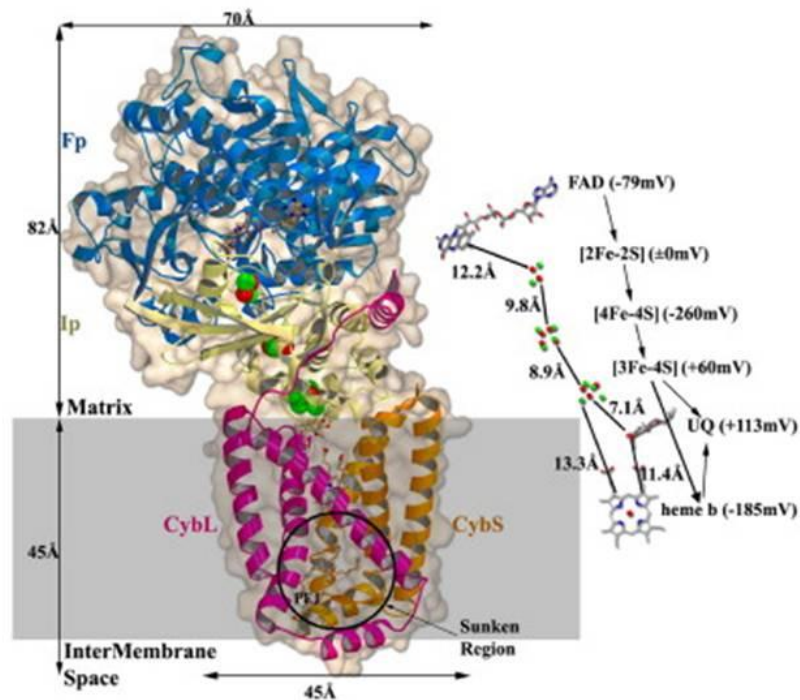


Figura 12 - Estrutura geral do complexo II – A fração Fp a azul; a fração Ip a bege; as proteínas transmembranais CybL e CybS a rosa e dourado respectivamente. A região membranar a cinzento.

(adaptado de Sun *et al.* 2005)

O défice isolado do complexo II é muito raro, representando aproximadamente 2-4% de todos os défices da OXPHOS (Horváth *et al.* 2006). As mutações no gene *SDHA* estão associadas com um largo espectro de fenótipos clínicos que vão desde encefalomiopatias de atingimento precoce, nomeadamente a doença de Leigh, à atrofia óptica nos adultos (Rustin *et al.* 2002a). As alterações nos genes *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* são uma causa frequente de paragangliomas familiares e feocromocitomas, sendo responsáveis por 30-54% de todos os casos (Bayley *et al.* 2010). Recentemente o gene de *assembly SDHAF2* foi igualmente associado com esta forma de tumor do pescoço e cabeça, enquanto no *SDHAF1* foram descritas mutações em duas famílias com leucoencefalopatia infantil (Ghezzi *et al.* 2009)

1.5.3 Complexo III

O complexo III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductase; complexo citocromo bc1) é o componente localizado a meio da OXPHOS, cataliza a transferência de electrões do ubiquinol para o citocromo c, à qual está associada a translocação de protões através da IMM (Figura 13). O complexo bc1 é na sua forma nativa um dímero, com cada um dos monómeros constituídos por 11 subunidades, das quais apenas uma, o citocromo b (*MTCYB*), é codificada pelo mtDNA (Fernandez-Vizarra *et al.* 2007). Três das subunidades têm funções catalíticas sendo responsáveis pela transferência de

electrões e incluem o citocromo b bem como o citocromo c1 (CYC1) e o centro Fe-S Rieske (RISP). As restantes subunidades codificadas pelo nDNA são as proteínas de *core* 1 e 2 (UQCRC1 e 2), a subunidade 6 que participa na formação do complexo, as subunidades 7 (UQCRB) e 8 (UQCRCQ) envolvidas na ligação a ubiquinona, a subunidade 9 (UQCRB) que interage com o citocromo c1 e a subunidade 10 que poderá funcionar como proteína de ligação ao RISP (Diaz *et al.* 2011). O citocromo b é uma proteína hidrofóbica altamente conservada que contém oito hélices transmembranares e dois grupos heme (Heme b_L e Heme b_H), essencial para o funcionamento e *assembly* do complexo III (Blakely *et al.* 2005). Vários genes nucleares têm sido implicados no *assembly* do complexo III nas leveduras, em que este processo tem sido vastamente investigado. Apesar do complexo III dos mamíferos possuir uma subunidade adicional relativamente a *S. cerevisiae*, a semelhança estrutural entre as enzimas das leveduras e dos mamíferos permitiu identificar dois genes de *assembly* no homem, o *BCS1L* (Bcs1 na levedura) e recentemente o *TTC19* (Fernández-Vizarra *et al.* 2009; Gezzi *et al.* 2011).

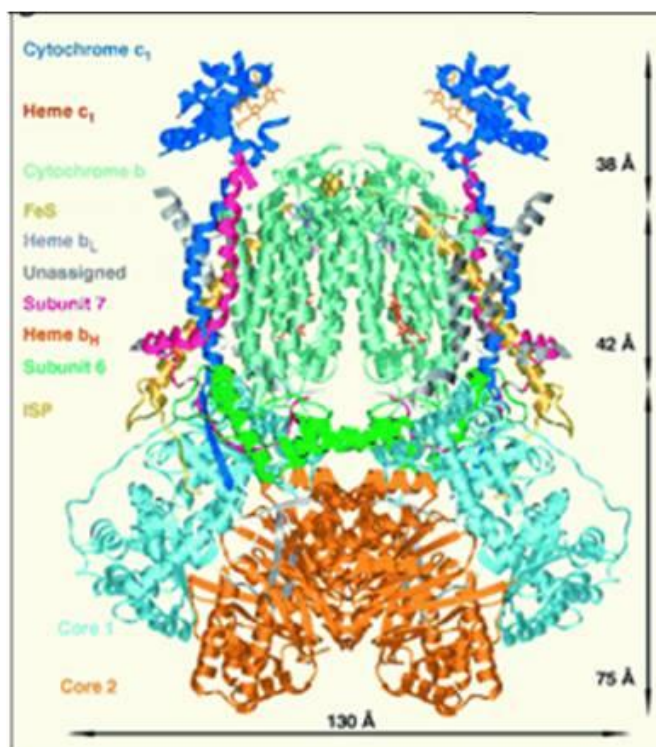


Figura 13- Estrutura parcial do modelo dimérico do complexo III.

(adaptado de Xia *et al.* 1997)

O complexo III oxida o ubiquinol no sítio Qo e reduz o citocromo c na face externa da IMM, produzindo semi-quinona, que será posteriormente oxidada pelo citocromo b, este processo é conhecido como o ciclo Q. As semi-quinonas produzidas são particularmente susceptíveis à auto-

oxidação produzindo superóxidos, em concordância com este facto, o complexo III reduzido será uma das maiores fontes destas moléculas na OXPHOS (Bénit *et al.* 2009).

O défice isolado do complexo III é raro, mas tem sido descrito em crianças e adultos com doenças neuromusculares, entre outras. Várias mutações têm sido detectadas no citocromo b, tendo sido apenas identificadas em quatro genes nucleares, dois estruturais e nos dois genes de *assembly* referidos anteriormente. De notar que, foram apresentados alguns casos de défice do complexo I em doentes com mutações no citocromo b, e de défices do complexo III em casos com alterações em genes nucleares do complexo I. Estas combinações sugerem que existe uma relação estrutural entre estes dois componentes da OXPHOS e são consistentes com a ocorrência de supercomplexos na CRM nos quais o citocromo b desempenha um papel importante (Acín-Pérez *et al.* 2004). As mutações no citocromo b associadas ao défice do complexo III foram descritas em numerosas apresentações clínicas nomeadamente encefalopatia, cardiomiopatia, LHON, displasia septo-óptica e numa doença multissistémica, no entanto, a maioria dos doentes apresenta uma intolerância marcada ao exercício e miopatia, frequentemente associadas a fraqueza muscular e mioglobínúria revelando RRFs na biópsia muscular (Blakely *et al.* 2005). As mutações em genes nucleares estruturais foram identificadas no *UQCRB* num paciente com hipoglicemia e acidose láctica e no *UQCRCQ* num caso com um fenótipo neurológico severo (Haut *et al.* 2003; Barel *et al.* 2008). A maioria das alterações nos genes nucleares do complexo III foi encontrada no *BCS1L* em três fenótipos: (1) o síndrome de Bjornstad, uma doença autossómica recessiva caracterizada por surdez neurosensorial e pili torti; (2) o síndrome de GRACILE (*growth retardation, amino aciduria, cholestasis, iron overload, lactic acidosis, and early death*), em que se verifica um atraso de crescimento fetal, aminoacidúria, colestase, sobrecarga de ferro, acidose láctica e morte prematura; e (3) encefalopatia isolada ou com um envolvimento visceral em recém-nascidos ou crianças (Morán *et al.* 2010). Recentemente foram descritos doentes com um défice severo do complexo III que apresentavam uma encefalopatia progressiva, com movimentos involuntários e regurgitações, em que foram identificadas mutações no gene que codifica o tetratricopeptídeo 19 (TTC19). Os estudos desenvolvidos mostraram que este deverá ser um factor de *assembly* já que se verificou uma acumulação de alguns elementos intermediários do *assembly* do complexo III (Gezzi *et al.* 2011).

1.5.4 Complexo IV

A citocromo c oxidase (COX) ou complexo IV é o componente terminal da CRM, cataliza a transferência de electrões do citocromo c para o oxigénio, à qual está associado o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranar, contribuindo a par dos complexos I e III para

o gradiente electroquímico necessário a síntese de ATP (Tsukihara *et al.* 1995). A COX eucariota é formada por 11 subunidades na levedura *S. Cerevisiae* e 13 no *Homo Sapiens*, sendo estas de origem bigenómica. A estrutura cristalográfica da COX de coração bovino, foi resolvida em 1996 por Tsukihara e colaboradores, tem uma parte que se estende na IMM e a outra, na face oposta, projectada na matriz mitocondrial (Tsukihara *et al.* 1996). As três subunidades mitocondriais, COX1-3, são proteínas transmembranares, largas, altamente hidrofóbicas e conservadas, que constituem o centro catalítico e estrutural da enzima incorporando todos os co-factores redox (Fontanesi *et al.* 2008). O complexo IV é activo sob a forma de dímero e necessita de vários grupos prostéticos para desempenhar a sua função catalítica: 2 hemes (a e a₃) no interior da COX1, dois centros de cobre (CuA e CuB) localizados na COX2 e COX1 respectivamente, zinco e magnésio. As outras dez subunidades estruturais (COX4, COX5a, COX5b, COX6a, COX6b, COX6c, COX7a, COX7b, COX7c and COX8), pequenas e periféricas, são codificadas pelo genoma nuclear, a sua função ainda não está completamente esclarecida, devendo estar envolvidas na regulação da actividade catalítica, protecção contra espécies ROS e estabilidade do complexo após o *assembly* (Diaz *et al.* 2010).

Como acontece para os outros complexos da CRM, a maioria da informação sobre o *assembly* foi obtida a partir de estudos funcionais de complementação nas leveduras, nomeadamente na *S. Cerevisiae*, em que foram identificados cerca de 30 genes. Destes, alguns possuem homólogos no homem, parte dos quais demonstraram ter relevância clínica. As metalochaperonas Sco1, Sco2 estão envolvidas no transporte/inserção de iões Cu (I/II) nos centros CuA e CuB; as proteínas Cox10, Cox15 e Surf1 são requeridas para a síntese e incorporação dos grupos heme; as proteínas LRPPRC (*leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette*) e TACO1 (activador de tradução 1) participam na expressão da COX1, participando na estabilização e tradução do mRNA (Stiburek *et al.* 2010).

O défice isolado do complexo IV representa um dos défices mais comuns da CRM e está associado a um vasto grupo de fenótipos (Tay *et al.* 2004). Apesar de já terem sido descritas mutações nos três genes codificados pelo mtDNA (COX1-3) e recentemente num gene nuclear estrutural (COX6B1), a maioria dos défices da COX foram identificados nos genes dos factores de *assembly* (Figura 14). As apresentações clínicas que resultam de alterações no mtDNA incluem miopatia, anemia sideroblástica, síndrome-like de esclerose amiotrófica lateral, encefalomiopatia e MELAS (Diaz *et al.* 2010). No gene COX6B1 foi detectada uma mutação em dois irmãos com uma encefalopatia infantil severa (Massa *et al.* 2008). As mutações no SURF1 estão geralmente associadas ao LS, síndrome também observado nos casos com alterações no COX10, COX15,

TACO1 e *LRPPRC* em que o fenótipo é menos grave e conhecido como síndrome de Leigh Franco-Canadiana. Outras doenças relacionadas com os factores de *assembly* incluem encefalocardiomiopatia (*SCO2*), hepatoencefalomiopatia (*SCO1*), tubulopatia e leucodistrofia (*COX10*) bem como cardiomiopatia (*COX15*) (Diaz *et al.* 2011).

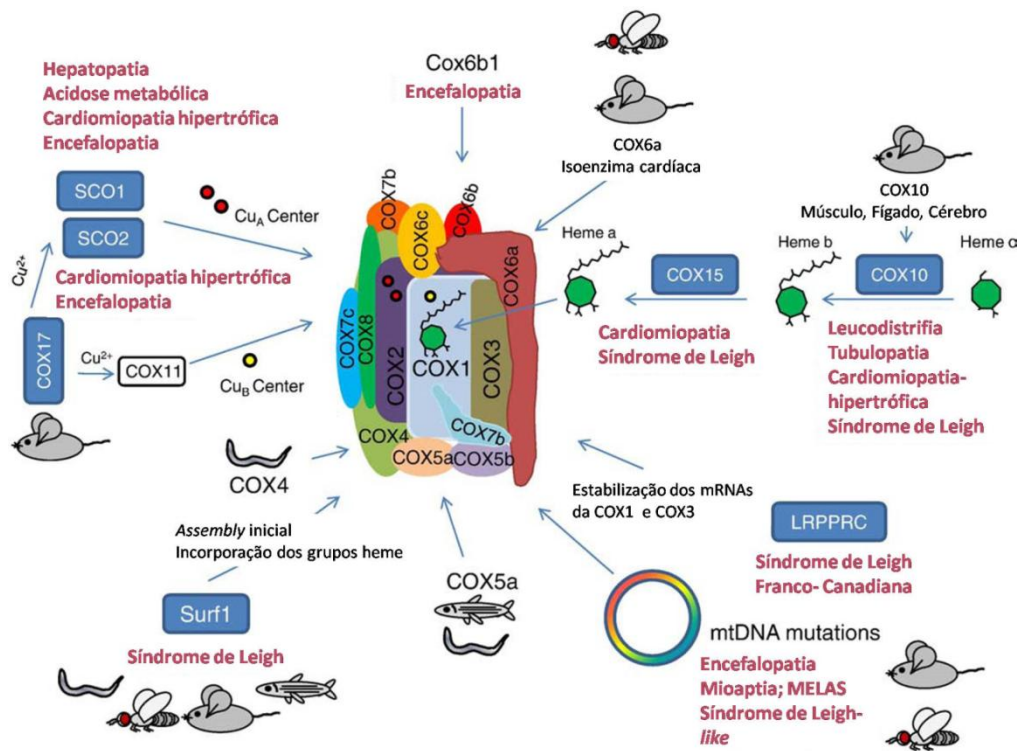


Figura 14 – Défices da COX – Os fenótipos associadas com mutações nas subunidades estruturais e factores de *assembly* estão a vermelho. Os modelos animais existentes para as correspondentes proteínas ou mtDNA são apresentados: rato, peixe-zebra, *Drosophila* e *C.elegans*.

(adaptado de Diaz, 2010)

1.5.5 Complexo V

O passo final da OXPHOS é desempenhado pela ATP sintase ou complexo V, esta utiliza a energia obtida através do gradiente electroquímico de prótons na IMM para a síntese de ATP por associação do ADP com o fosfato inorgânico. O complexo V, com uma massa de aproximadamente 600 kDa, possui um domínio membranar hidrofóbico (F0) responsável pelo canal de prótons, e um componente hidrofílico (F1) com cinco subunidades (3 α , 3 β , γ , δ , e ϵ) que constitui o domínio catalítico. As duas partes da ATP sintase estão unidas por dois “braços”, um central que incorpora as subunidades γ , δ , e ϵ da porção F1 e um braço periférico estático (Davies *et al.* 2011). O número de subunidades da porção F0 é variável em diferentes organismos enquanto as estruturas do domínio F1 demonstram uma elevada conservação. A ATP sintase

possui pelo menos 14 subunidades codificadas pelo nDNA, cinco correspondem a F₁ e as restantes ao domínio F₀ que contém igualmente duas proteínas codificadas pelo mtDNA, a ATP6 e 8 (Wittig & Schagger, 2008).

A força motriz da síntese de ATP  então a translocação de protoes atraves da IMM atraves do componente F₀ da enzima. Esta translocação é mediada por um estreito arranjo entre a subunidade a e um anel de subunidades c. O fluxo de protoes atraves da porção F₀ resulta na rotação do anel-c juntamente com o “braço central” (Figura 15). Em consequência desta rotação, os tres sítios catalíticos da F₁ transitam sequencialmente por tres estados que favorecerão a ligação do ADP ao Pi e a consequente síntese de ATP (Kucharczyk *et al.* 2009).

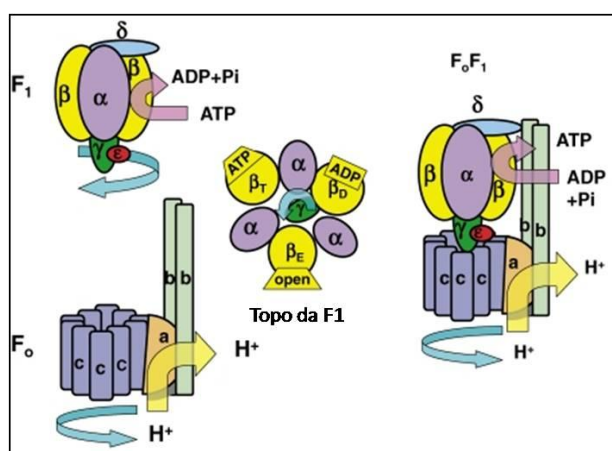


Figura 15 – Estrutura básica dos domínios da ATP sintase e do “motor” de síntese de ATP.

(adaptado de Kagawa, 2010)

A biognese da ATP sintase é um processo complexo, que depende da expressão coordenada dos genomas mitocondrial e nuclear. De entre os vários factores necessários para o assembly do complexo V conhecidos nas leveduras, apenas dois foram identificados no homem como sendo funcionalmente activos, ATP11 e 12 (Wang *et al.* 2001).

O défice do complexo V é relativamente raro, embora possa estar sub-estimado devido as particularidades da sua determinação, não sendo esta disponibilizada em todos os centros de diagnóstico. Foram identificadas mutações patognicas nos dois genes mitocondriais e no gene de *assembly* ATP12 (Kucharczyk *et al.* 2009). As mutações no gene *MTATP6*, associadas a síndrome de NARP/Leigh, são as mais frequentes destacando-se as substituições no nucleotídeo 8993, m.8993T>G e m.8993T>C (Figura 16). Foram igualmente descritas duas mutações no gene *MTATP8*, o primeiro caso apresentava uma cardiomiopatia hipertrófica e neuropatia, recentemente foi reportado um paciente com uma apresentação multissistmica severa

(Jonckheere *et al.* 2008; Mkaouar-Rebai *et al.* 2010). No factor de *assembly* ATP12 foi detectada uma mutação missense em homozigotia num paciente com uma acidose láctica severa, cardiomiopatia hipertrófica e acidúria metilglutacónica (De Meirleir *et al.* 2004).

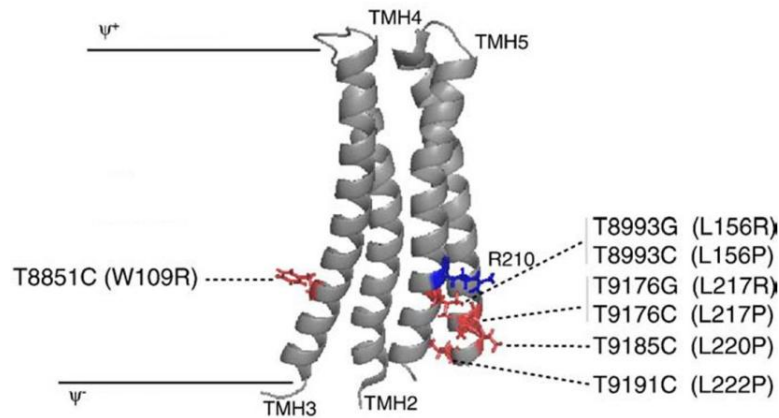


Figura 16 – Posições das mutações patogénicas no *MTATP6* no modelo 3D da subunidade a *E. Coli*

(adaptada de Kucharczyk *et al.* 2009)

1.6 Síndromes associadas com mutações no mtDNA

1.6.1 MELAS - Encefalopatia mitocondrial, com acidose láctica e episódios de enfarte *like*

Após a primeira descrição da síndrome de MELAS por Pavlakis em 1984, e um resumo dos casos descritos com o seu colega Hirano dez anos depois, foram estabelecidos três critérios que definem invariavelmente esta doença, (1) episódios de *stroke-like* antes dos 40 anos; (2) encefalopatia caracterizada por convulsões, demência ou ambos; (3) acidose láctica, fibras rasgadas e vermelhas (RRFs - *Ragged-Red Fibers*: achado histológico característico das CM), ou ambos (Pavlakis *et al.* 1984; Hirano *et al.* 1994). Entretanto houve uma expansão dos fenótipos clínicos que incluem sobreposição de síndromes, bem como um reconhecimento crescente do atingimento multissistémico. A MELAS é uma das CM associadas a mutações no mtDNA mais frequente, com uma elevada morbilidade e mortalidade (Mezghani *et al.* 2011). Os primeiros sintomas aparecem entre os 2 e 20 anos em 70% dos casos. A maioria das crianças tem inicialmente um desenvolvimento normal, podendo então apresentar dores de cabeça repetidas, vômitos recorrentes ou défices neurológicos que se assemelham a enfartes, seguidos por convulsões. Muitas revelam igualmente fadiga fácil, baixa estatura, dificuldades de aprendizagem e desenvolvem surdez neurosensorial ao longo do tempo (Longo *et al.* 2008). Uma das

manifestações sistêmicas mais frequente é a diabetes, outros sintomas poderão estar presentes como cardiomiopatia, retinite pigmentosa, tubulopatia renal, miopatia facial, do tronco e membros, entre outros. A MELAS pode surgir “de novo” e alguns familiares poderão ser oligossintomáticos não manifestando a síndrome no seu todo, ou até assintomáticos (Sproule & Kaufmann, 2008).

Duas alterações histológicas frequentemente encontradas na biópsia muscular e que permitirão distinguir a MELAS de outras CM são os vasos sanguíneos SDH positivos (SSVs - *Strongly Succinate dehydrogenase-reactive blood vessels*) e as RRFs com COX positiva, negativa ou normal. As imagens por ressonância magnética (MRI – *Magnetic Resonance Imaging*) demonstram os *stroke-like* através de lesões assimétricas nos lobos occipital e parietal, estas geralmente não coincidem com territórios vasculares permitindo distinguir estes enfartes dos de origem vascular. O doseamento da actividade enzimática dos complexos da CRM revela em mais de metade dos doentes um défice do complexo I ou I + IV (Lorenzoni *et al.* 2009).

A MELAS é geralmente causada por mutações no gene *MTTL1*. A mutação m.3243A>G foi a primeira a ser descrita e é igualmente a mais frequentemente associada a esta síndrome, sendo responsável por 80% dos casos, sendo as mutações m.3271T>C e m.3252A>G no mesmo gene detectadas em 15% dos doentes (Longo *et al.* 2008). Foram também encontradas mutações nos genes de outros tRNAs (*MTTF*, *MTTV*, *MTTQ* e *MTTF*) e genes estruturais (*MTND1*, *MTND4*, *MTND5*, *MTND6*, *MTCYB* e *MTCO3*). O gene *MTND5* foi mais tarde considerado um *hotspot* para mutações associadas com a MELAS, às vezes em sobreposição com outras síndromes como a MERRF, LHON e MILS (Choi *et al.* 2008). As mutações presentes na MELAS, e particularmente a m.3243A>G podem apresentar um nível de heteroplasmia muito diverso entre tecidos, sendo ainda mais evidente em doentes oligossintomáticos ou assintomáticos, que podem apresentar níveis muito baixos no sangue resultando em falsos negativos. Apesar de o tecido muscular ser o que melhor reflecte a taxa de mutação, foi demonstrado que a urina seria uma alternativa fiável para a pesquisa da mutação e mais indicada que o sangue (Maa *et al.* 2009).

1.6.2 MERRF – Epilepsia mioclónica com RRFs

A MERRF foi definida como uma síndrome caracterizada por mioclonias, com crises generalizadas tônico-clônicas, miopatia progressiva com RRFs (Figura 17), epilepsia e ataxia (Fukuhara *et al.* 1980). Outros sintomas menos frequentes incluem demência, surdez, cardiomiopatia, atrofia do nervo óptico e lipomatose. Os familiares da linha materna poderão manifestar uma grande variedade de fenótipos. Esta síndrome ocorre geralmente nas crianças ou jovens adultos, podendo aparecer em sobreposição com outras síndromes (Lorenzoni *et al.* 2011). Em 1990, a

mutação m.8344A>G no gene do tRNALys, foi descrita em três doentes com MERRF não relacionados, dois anos depois foi identificada outra mutação no mesmo gene, m.8356T>C, associada com este fenótipo (Shoffner *et al.* 1990; Silvestri *et al.* 1992). A m.8344A>G é responsável por 80%-90% dos casos, existe uma boa relação genótipo/fenótipo no entanto o limiar de expressão é superior ao da m.3243A>G associada a MELAS. Também se verifica heterogeneidade genética na síndrome de MERRF, podendo ser causada por outras mutações no gene *MTTK* (m.8361G>A e m.8363G>A) constituindo este um *hotspot* para esta síndrome, bem como noutros genes dos tRNAs (*MTTF* e *MTTH*), todas as mutações foram detectadas em heteroplasmia (Zifa *et al.* 2007) .

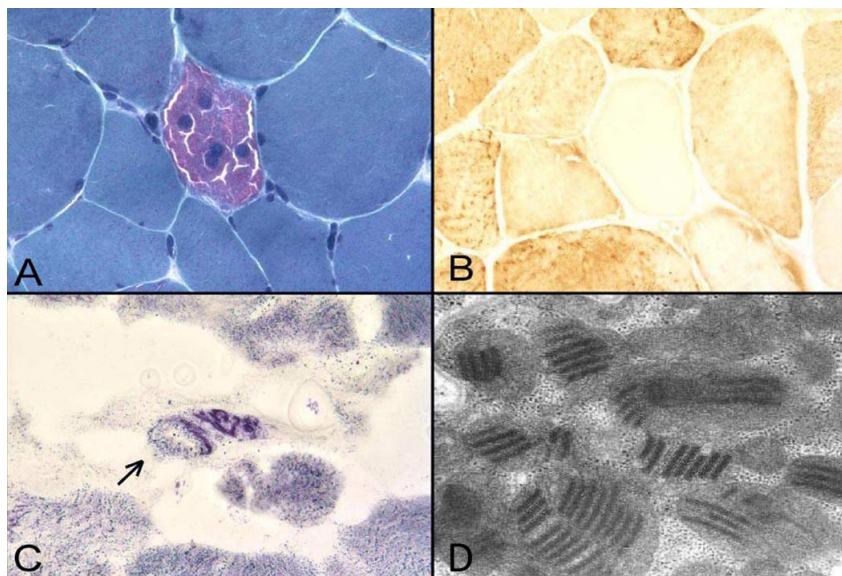


Figura 17 – Achados histopatológicos clássicos na miopatia mitocondrial – A: coloração de Gomori (RRFs). B: Coloração para a COX: (fibras COX negativas). C: Coloração para a SDH (aumentada nos vasos sanguíneos). D: Microscopia electrónica (inclusões paracristalinas)

(adaptada de Fraser *et al.* 2010)

1.6.3 NARP - Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa; MILS - Síndrome de Leigh de hereditariedade materna.

A síndrome de NARP foi descrita em 1990, em quatro membros de uma família com atraso de desenvolvimento, fraqueza muscular, retinite pigmentosa, demência, convulsões, ataxia e neuropatia sensorial, em que foi identificada a mutação m.8993T>G em heteroplasmia no gene *MTATP6*, associada a uma hereditariedade materna (Holt *et al.* 1990). Os fenótipos causados pela m.8993T>G são variáveis, a gravidade da doença será determinada pelo nível de heteroplasmia podendo diferenciar-se três a quatro tipos de apresentações. A mais grave aparece na infância sob a forma de síndrome de Leigh, com uma taxa mutacional superior a 90%, esta entre os 75-

90% causará NARP, podendo na adolescência ou durante a idade adulta estar relacionada com um curso menos severo ou até ser assintomática se for igual ou inferior a 60-75% (Keränen & Kuusisto, 2006). A LS é clínica e geneticamente heterogénea podendo resultar de mutações pontuais no mtDNA – MILS, ou de alterações em genes nucleares da OXPHOS, da coenzima Q ou da piruvato desidrogenase. A incidência da LS está estimada em 1:40 000 nados vivos, a idade de atingimento é geralmente nos dois primeiros anos de vida, sendo rara nos adultos. É uma doença neurodegenerativa com características neuroradiológicas e neuropatológicas típicas. Os doentes manifestam geralmente um declínio progressivo do sistema nervoso central devido as lesões necrotizantes focais nos gânglios da base, diencéfalo, cerebelo, ou tronco cerebral (e.g. lesões hipertensas em T2 na MRI). Os sintomas característicos incluem regressão, atraso do desenvolvimento psicomotor, fraqueza, hipotonia, ataxia do tronco, e acidose láctica no sangue, líquido cefalorraquidiano, ou urina. O défice do complexo I da CRM é o mais comum, seguido pelo do complexo IV e em casos raros do complexo II (Finsterer, 2008).

A mutação mais frequentemente associada às síndromes NARP e LS é a já referida m.8993T>G no gene *MTATP6*. Foi identificada outra substituição no mesmo codão, a m.8993T>C, responsável por um fenótipo menos severo e com um limiar de expressão mais elevado, as alterações neste nucleótido parecem ser a causa genética mais frequente da síndrome de Leigh podendo ser detectadas em cerca de 15-20% dos casos (Makino *et al.* 2000). Vários estudos demonstraram que existe uma boa relação genótipo/fenótipo para a m.8993T>G e que o risco de recorrência da doença nos descendentes de uma mulher portadora aumentará proporcionalmente com o nível de heteroplasmia detectado no sangue da mãe, sendo assim possível oferecer um diagnóstico pré-natal (Steffan *et al.* 2007). Foram identificadas outras mutações no gene *MTATP6* (m.9176T>C/G, m.9185T>C e m.9191T>C), bem como nos genes estruturais do complexo I, a maioria nos genes *MTND3* e *MTND5*, algumas no *MTND6* e *MTND4*. E adicionalmente foram identificadas alterações em casos pontuais nos genes dos tRNAs triptofano, lisina e valina (Leshinsky-Silver *et al.* 2010).

1.6.4 LHON – Neuropatia óptica hereditária de Leber.

O epónimo “Neuropatia óptica hereditária de Leber” deriva do nome de um oftalmologista Alemão, Theodor Karl Gustav von Leber, que no século XIX descreveu uma série de doentes que perderam a visão, ainda jovens, nos dois olhos consecutivamente (Leber, 1981). Até há relativamente pouco tempo, a LHON era diagnosticada com base na descrição de Leber. O elevado número de diferentes mutações associado a este fenótipo faz com que este possa ser considerado como uma síndrome. Apesar de a LHON ter sido classificada como uma “neuropatia

óptica hereditária monossintomática”, alguns doentes podem apresentar sintomas adicionais que poderão ser explicados através da disfunção mitocondrial e podem estar relacionados com o CNS (convulsões, tremores, doenças de movimento) e coração (e.g. défices de condução), sendo então denominada de “*Leber’s Plus*” (Eichhorn-Mulligan & Cestari, 2008).

A LHON é a CM primária mais frequente com uma prevalência mínima de 1 em 31 000 indivíduos afectados no Nordeste de Inglaterra e 1 em 8500 portadores com risco de perda de visão. Noutras populações Caucasianas foram reportados números semelhantes, com prevalências de 1 em 39 000 na Holanda e 1 em 50 000 na Finlândia. A idade de atingimento situa-se geralmente entre os 15 e 30 anos e 95% dos doentes perderão a visão antes dos 50 anos (Yu-Wai-Man *et al.* 2009). A apresentação típica consiste na atrofia isolada do nervo óptico, envolvendo uma perda de visão central rápida e indolor num olho, seguida pela perda no outro olho num período de dias a vários meses. Em mais de 97% dos doentes o envolvimento do segundo olho ocorre no período de um ano, sendo o intervalo médio entre os episódios de seis a 8 semanas. O atingimento simultâneo pode acontecer mas poderá incluir situações em que a perda de visão no primeiro olho passou despercebida. O exame do fundo do olho na fase aguda mostra hiperémia, pseudo-edema e telangectasias papilares. A gravidade da doença será variável entre doentes mas igualmente entre membros da mesma família, por vezes a percepção da luz será preservada e poderá ocorrer a recuperação de parte da visão, mesmo passados alguns anos (Fraser *et al.* 2010).

No final da década de 80, foi identificada a primeira mutação no mtDNA e associada com a LHON, a m.11778G>A no gene *MTND4* (Wallace *et al.* 1988). Poucos anos depois duas outras mutações foram encontradas em doentes com LHON, a m.3460A>G e a m.14484T>C nos genes *MTND1* e *MTND6* respectivamente (Howell *et al.* 1991; Johns *et al.* 1992). Estas são consideradas as mutações primárias e mais frequentemente associadas a LHON sendo responsáveis por mais de 90% dos casos, essencialmente a m.11778G>A. O diagnóstico da LHON pode geralmente ser feito com base na clínica, especialmente se houver evidências de hereditariedade materna, mas a pesquisa destas três mutações poderá permitir a confirmação do diagnóstico e a distinção entre outras neuropatias ópticas com características clínicas sobreponíveis (Yu-Wai-Man *et al.* 2009). A mutação m.3460A>G é considerada a mais severa, a m.11778G>A produzirá um fenótipo intermédio e a m.14484T>C é a mais moderada. A possibilidade de recuperação visual depende do tipo de mutação, sendo mais frequente para a m.14484T>C, e da idade de atingimento que quanto menor for mais favorecerá a hipótese de melhorias, apesar de a LHON raramente se manifestar em doentes jovens e crianças. Foram identificadas outras mutações essencialmente nos genes estruturais do complexo I, algumas foram consideradas secundárias e outras aguardam

a confirmação de patogenicidade representando casos isolados. A distribuição destas alterações não é uniforme no entanto os genes *MTND1* e *MTND6* parecem ser *hotspots* (Tońska *et al.* 2010). A LHON apresenta duas particularidades não completamente esclarecidas, a penetrância incompleta e a maior incidência no sexo masculino, 50% dos homens perderão a visão o que acontecerá com apenas em 10% das mulheres. Assim o risco de perda de visão está relacionado com a presença de uma mutação primária mas outros factores deverão estar envolvidos. O esclarecimento desta questão não tem sido evidente apesar dos numerosos estudos desenvolvidos, no entanto, estes apontam para um modelo complexo que incluirá factores genéticos e ambientais. Relativamente aos factores extrínsecos, alguns estudos referem que o consumo de álcool e tabagismo poderão contribuir para o fenótipo (Yu-Wai-Man *et al.* 2011). Um dos factores genéticos envolve o efeito dos haplogrupos, a primeira evidência surge em 1997. Quatro investigações concomitantes em doentes de diversas origens Europeias revelaram que as mutações m.11778G>A e m.14484T>C estavam preferencialmente associadas com o haplogrupo J. Esta observação trouxe a noção de que o “motivo mutacional” dos genes estruturais MT-ND que define o haplogrupo J — 4216C/ND1-10398G/ND3-13708A/ND5 — poderia aumentar a penetrância das mutações 11778A/ND4 e 14484C/ND6 e o risco de expressão da doença (Torrioni *et al.* 1997). As diferentes investigações que se seguiram têm revelado que esta questão é complexa não estando totalmente comprovada apesar de existirem muitos estudos que confirmam esta associação (Carelli *et al.* 2006; Tońska *et al.* 2010). Relativamente a maior incidência da m.11778G>A nos homens, um estudo recente em que foram utilizados marcadores de microsátélites confirmou que poderá haver uma ligação significativa ao cromossoma X, com algumas das regiões candidatas mostrando áreas de sobreposição (Ji *et al.* 2010).

1.6.5 Diabetes mitocondrial; MIDD – Diabetes e surdez de hereditariedade materna.

Os défices no mtDNA foram reconhecidamente associados à diabetes mitocondrial, mas têm sido mais frequentemente encontrados quando a surdez está igualmente presente - MIDD (*Maternally Inherited Diabetes and Deafness*). A MIDD é assim a forma de diabetes mitocondrial mais frequente. No entanto, a sua apresentação inicial é frequentemente semelhante a da diabetes tipo 2. A MIDD é caracterizada por uma idade de atingimento média de 37 anos, manifestando-se em indivíduos magros, com antecedentes de diabetes na linha materna em 60% dos casos. Dois fenótipos distintos foram descritos, numa minoria (17%) a apresentação clínica é a da diabetes tipo 1, a segunda forma ou MIDD2, observada em 83% dos doentes, assemelha-se a uma diabetes tipo 2 com uma idade de início mais tardia, maior peso, e uma evolução progressiva no sentido da dependência de insulina após em média 11 anos. As perturbações da audição estão presentes em

90% dos casos tratando-se de uma surdez neurosensorial bilateral. Outros sintomas podem estar presentes, como as lesões oculares e renais, miopatia, cardiomiopatia, atingimento neurológico e alterações psiquiátricas (Meas *et al.* 2010).

A associação entre a doença mitocondrial e a diabetes está agora bem estabelecida para a mutação m.3243A>G, podendo nalgumas populações ser responsável por 3% de todos os casos de diabetes. Um decréscimo na secreção de insulina, induzida pela glicose pelas células pancreáticas beta, bem como um envelhecimento prematuro destas células parece ser o processo pelo qual a m.3243A>G causa diabetes (Walker *et al.* 2005). A diabetes também foi descrita em casos com deleções simples de grande tamanho no mtDNA e outras mutações nos genes dos tRNAs, como a m.14709T>C no gene do tRNAGlu (Hanna *et al.* 1995). Um acompanhamento das complicações da diabetes em doentes com a forma mitocondrial será recomendado, independentemente da taxa de mutação (Whittaker *et al.* 2007).

1.6.6 Surdez neurosensorial

A surdez afecta cerca de 10% da população mundial. Pode ser classificada com base na idade (pré e pós-lingual), no tipo de défice (condutivo, neurosensorial, ou ambos), no grau de surdez (fraca, moderada, grave ou profunda), e pode ser síndrómica ou não síndrómica. As formas de surdez congénita/pré-lingual são sempre neurosensoriais, cerca de metade resultam de factores ambientais (drogas ototóxicas como os aminoglicosídeos; infecções bacterianas/virais ou traumatismos) e as restantes de causas genéticas. Setenta por cento dos casos genéticos são não síndrómicos e os restantes 30% síndrómicos. Dos não síndrómicos 22% são de transmissão autossómica dominante (DFNA – *Deafness, autosomal dominant*), 77% de transmissão autossómica recessiva (DFNB – *Deafness, autosomal recessive*), os restantes 2% são atribuídos a surdez ligada ao X e mitocondrial. Com a idade a prevalência das formas autossómica dominante e mitocondrial aumenta enquanto a de transmissão autossómica recessiva diminui. A surdez mitocondrial tende a ser progressiva manifestando-se entre os 5-50 anos, podendo o seu grau ser variável (Lingala *et al.*, 2009). Várias estruturas do ouvido interno têm uma elevada actividade metabólica e taxas de reprodução, assim a cóclea será altamente sensível a disfunção mitocondrial o que explica o facto da surdez neurosensorial (SNHL – *Sensorineural Hearing Loss*) ser um dos sintomas das CM.

As mutações nos genes do 12S rRNA e do tRNA^{UCN} Ser são as alterações no mtDNA mais frequentemente associadas a surdez neurosensorial. De entre as mutações no gene *MTRNR1*, a m.1555A>G e a m.1494C>T têm sido descritas na surdez não síndrómica e induzida por aminoglicosídeos em todo o mundo. A patogenicidade das outras mutações neste gene

(m.827A>G, m.961delT, m.961insC(n), m.1005T>C and m.1095T>C) não está totalmente esclarecida, mas o *MTRNR1* parece ser um *hotspot* para alterações que causam SNHL não síndrômica bem como induzida por aminoglicosídeos (Mkaouar-Rebai *et al.* 2010). No gene *MTTS1* foram identificadas três mutações (m.7472insC, m. 7510T>C e m.7511T>C) associadas com surdez não síndrômica. Adicionalmente, as mutações m.7444G>A, m.7445A>G e m.7445A>C no precursor do *MTTS1* foram detectadas em *pedigrees* caucasianos e asiáticos, estas mutações ocorrem geralmente em homoplasmia (Chen *et al.* 2008). Foi igualmente observado que a NSHL é um sintoma frequente da m.3243A>G. As substituições m.1555A>G e m.3243A>G são detectadas em aproximadamente 6% dos adultos com SNHL sem causa conhecida. A m.3243A>G pode igualmente ser responsável por SNHL síndrômica, quando associada a fenótipos como a MELAS e MIDD (Matsunaga, 2009). A penetrância da m.1555A>G é muitas vezes incompleta, alguns indivíduos portadores não apresentam surdez. Para além disso, os familiares da linha materna, apesar de terem a mesma mutação exibem graus de surdez, idade de atingimento e penetrância variáveis. Assim, outros factores deverão estar envolvidos podendo incluir factores ambientais, genes nucleares modificadores e haplogrupos mitocondriais (Tang *et al.* 2010).

Num estudo, recentemente publicado, desenvolvido no Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães que envolveu a pesquisa de mutações no mtDNA em 95 crianças com SNHL (53 não síndrômica e 42 síndrômica) foram detectadas alterações em 4,2% dos casos. A maioria das investigações são efectuadas em doentes com surdez não síndrômica, no entanto a incidência encontrada pelo nosso grupo é relativamente superior a descrita noutros estudos que envolvem a surdez síndrômica. A pesquisa de mutações no mtDNA deverá então ser considerada nos casos de surdez sem causa conhecida, a não ser que uma hereditariedade materna possa ser totalmente excluída. Este diagnóstico molecular permitirá um aconselhamento genético mais adequado, monitorar possíveis complicações multissistémicas e evitar o uso de aminoglicosídeos se ocorrerem infecções (Nogueira *et al.* 2011).

1.6.7 Cardiomiopatia

A cardiomiopatia é umas das complicações mais comuns das CM, sendo geralmente hipertrófica não obstrutiva também pode ser encontrada sob a forma dilatada. Quando o coração está primariamente afectado nas CM, a distinção das outras cardiomiopatias pode ser difícil. A possibilidade de diagnóstico será superior se forem identificadas alterações histopatológicas e um défice enzimático da OXPHOS no tecido cardíaco o que geralmente não é exequível (Zaragoza *et al.* 2011). As publicações sobre cardiomiopatia mitocondrial são escassas, uma revisão de 1992 e um estudo de Holmgren e colegas em 2003 permitiram uma estimativa da incidência nas

crianças e jovens adultos em 1/50 000, bem como observar que uma cardiomiopatia hipertrófica poderá ocorrer em cerca de 20% das crianças com CM. Metade dos doentes desenvolverão falência cardíaca, terão um mau prognóstico e a taxa de mortalidade será de 70% antes dos 30 anos. A função cardíaca poderá deteriorar-se rapidamente mas o transplante cardíaco será apenas possível em metade dos doentes (Guenthard *et al.* 1995; Holmgren *et al.* 2003). Uma elevada prevalência de envolvimento cardiovascular foi recentemente reportada nos adultos com CM, 25% apresentaram alterações ecocardiográficas que evidenciaram maioritariamente cardiomiopatia hipertrófica. Ao contrário das descrições nas crianças a incidência de complicações severas foi baixa (Limongelli *et al.* 2010). As mutações no mtDNA associadas a cardiomiopatia descritas até à data estão essencialmente localizadas nos genes dos tRNAs (*MTTL1/2*, *MTTI*, *MTTK*, *MTTG*, *MTTH*) mas também foram detectadas duas mutações no gene do citocromo b. A maioria dos doentes apresentava cardiomiopatia hipertrófica como parte de um envolvimento multissistémico, o gene *MTTI* é o mais mutado e frequentemente associado a falência cardíaca (<http://mitomap.org/MITOMAP>). Uma CM deverá ser considerada no diagnóstico diferencial de doentes que manifestam uma cardiomiopatia hipertrófica, o estudo molecular poderá ser disponibilizado em sangue não esquecendo que a taxa mutacional será mais representativa no tecido cardíaco, que normalmente só poderá ser estudado em doentes que já faleceram (McFarland *et al.* 2009).

1.6.8 CPEO - Oftalmoplegia externa progressiva crónica; PS - Síndrome de Pearson e KSS - Síndrome de Kearns-Sayre

A KSS, PEO e CPEO partilham a presença de oftalmoplegia externa o que poderá dificultar o diagnóstico diferencial. O que une estas três apresentações com a PS é o facto de serem geralmente causadas por deleções simples de grande tamanho no mtDNA.

1.6.8.1 CPEO - Oftalmoplegia externa progressiva crónica

Esta síndrome é uma das apresentações de doença mitocondrial mais comum nos adultos e é caracterizada por uma parésia lentamente progressiva da musculatura do olho, ptose bilateral, fraqueza proximal moderada, fadiga e a medida que a doença evolui, défice de condução cardíaca (Figura 18). Em muitos doentes o primeiro sintoma é uma ptose assimétrica no final da terceira década de vida (McFarland *et al.* 2009). Uma deleção comum de 4977 pb no mtDNA, de carácter esporádico, é a causa da CPEO em 60% dos casos, tendo sido descritas outras deleções simples de diversos tamanhos. A m.3243A>G é a mutação pontual mais frequentemente associada a CPEO

de transmissão materna. Outras mutações nos genes do tRNA^{Leu} e tRNA^{Ala} foram detectadas associadas a este fenótipo (Zifa *et al.* 2007).

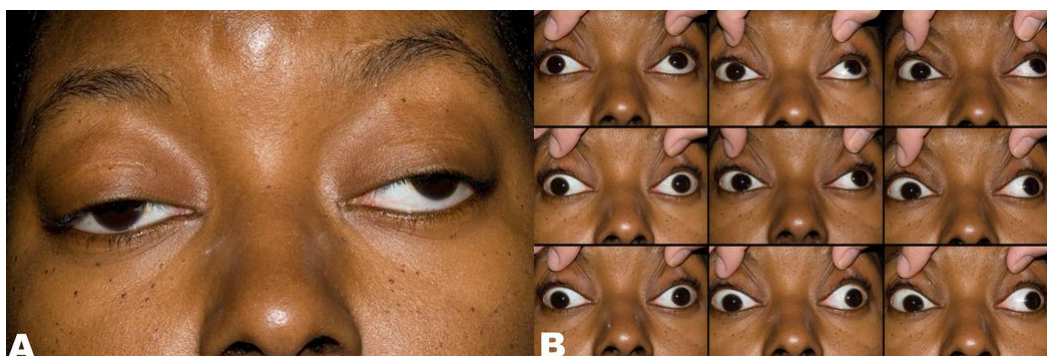


Figura 18 – Fotografia característica da CPEO. (A) Ptose bilateral; (B) Limitação na mobilidade ocular em todas as direcções nos dois olhos.

(Adaptada de Fraser *et al.* 2010)

1.6.8.2 KSS - Síndrome de Kearns-Sayre

A KSS é geralmente uma doença esporádica com atingimento antes dos 20 anos de idade. Para além da PEO e retinopatia pigmentar os doentes apresentam um bloqueio da condução cardíaca, uma síndrome cerebelosa ou a proteína do líquido cefalorraquidiano (LCR) > 100 mg/dL. Entre os sintomas adicionais estão a surdez, diabetes, baixa estatura e demência. As deleções simples, geralmente a comum, são a causa genética da KSS em 70% dos casos. Também foram descritas duplicação do mtDNA e mutações pontuais no gene do tRNA^{Leu} (Thajeb & Dai, 2007).

1.6.8.3 PS - Síndrome de Pearson

A síndrome de Pearson é uma doença esporádica muito rara da infância, geralmente do primeiro ano de vida, caracterizada por apresentações multissistémicas como anemia sideroblástica e pancitopenia, insuficiência pancreática exócrina severa com sinais intestinais e má absorção. Nalguns doentes a hepatopatia com falência do fígado pode constituir uma manifestação tardia. As poucas crianças com PS que sobrevivem até a adolescência desenvolverão a clínica da KSS. A causa comum é uma deleção simples de grande tamanho, as vezes também duplicação, ao contrário do que acontece nas outras síndromes as deleções podem ser detectadas no sangue (Di Donato, 2009).

1.7 Genes nucleares e fenótipos associados

Durante os muitos milénios de relação simbiótica com o nDNA, o mtDNA perdeu grande parte dos seus genes e consequentemente da sua autonomia, e depende agora de factores nucleares para todas as suas funções básicas (DiMauro & Schon, 2008). Cerca de 1500 proteínas são expressas na

mitocôndria, um déficit num dos genes que as codificam poderá levar a uma citopatia mitocondrial mesmo que secundária. No entanto, o déficit genético permanece por esclarecer em muitos casos em que se suspeita de uma CM de origem nuclear, já que foram apenas descritas mutações em cerca de 150 genes nucleares (Wong, 2010). Estas mutações podem afectar: (i) as subunidades estruturais dos complexos da CRM, (ii) as proteínas acessórias, (iii) a comunicação intergenómica comprometendo a manutenção e expressão do mtDNA, (iv) as enzimas da biosíntese dos lípidos e seus cofactores, (v) a coenzima Q, (vi) os mecanismos de transporte e tradução ou (vii) proteínas da biogénese mitocondrial, entre outras (Spinazzola & Zeviani, 2009).

Na abordagem que está referida no algoritmo, apresentado nos resultados, constarão os genes nucleares envolvidos nos três primeiros pontos e as síndromes a que estão associados. No entanto, não tendo sido estudados a nível prático, encontra-se no ANEXO I uma revisão bibliográfica sobre estes genes e os fenótipos causados pela sua mutagénese.

OBJECTIVOS

2 Objectivos

Os objectivos deste trabalho foram:

- (i) Proceder a uma revisão bibliográfica sobre os genes mitocondriais e nucleares envolvidos nas CM.
- (ii) Elaborar um algoritmo para o estudo molecular das citopatias mitocondriais com base nos dados clínicos, histoquímicos e bioquímicos, na experiência adquirida nesta área durante mais de uma década bem como na revisão da literatura.
- (iii) Efectuar o estudo genético do mtDNA conforme especificado nalgumas das vias do algoritmo.
- (iv) Avaliar as vias do algoritmo que envolvem o genoma mitocondrial em função dos resultados obtidos ao longo deste trabalho bem como em anos anteriores.

DOENTES E MÉTODOS

3 Doentes e Métodos

3.1 Doentes e amostras biológicas

Um total de 822 doentes com suspeita de CM (de todos os grupos etários) foi estudado com base nos dados clínicos, histoquímicos e bioquímicos disponíveis. Estes incluem indivíduos cujas amostras foram recebidas nos últimos cinco anos no Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães.

Assim foram seleccionados: **(i)** 546 doentes (identificados nas tabelas com o prefixo R - Rotina) com base nos dados referidos anteriormente mas sem uma síndrome clássica ou bem definida; foram recebidas amostras de sangue de 198 destes doentes e biópsia de músculo deltóide dos restantes 398 (em 66 foi identificado um défice isolado ou combinado da CRM). Em 59 dos doentes com um défice bioquímico da CRM e/ou uma clínica sugestiva, foi efectuada a pesquisa de deleções por *Southern-Blotting* (Tabela 1). Destes 59 doentes, em 23 procedeu-se à sequenciação do mtDNA completo (denominados com o prefixo MT - Tabela 2); **(ii)** 95 doentes com LHON (prefixo L) **(iii)** 31 doentes com surdez neurosensorial (prefixo SN) **(iiii)** 38 doentes com cardiomiopatia (prefixo C), e **(iiiii)** 112 doentes com sintomatologia associada a MELAS (prefixo M). Dos quatro últimos grupos de doentes foram recebidas apenas amostras de sangue.

Tabela 1 - Doentes com pesquisa de deleções por *Southern-Blotting*

Paciente	Idade	CRM	Sinais e sintomas
S1	44A	Normal	PEO; RRFs
S2	19A	Normal	Ptose
S3	40A	Normal	PEO; diabetes
S4	79A	Normal	PEO; surdez neurosensorial; ataxia cerebelosa; tetraparésia
S5	27A	Normal	CM
S6	54A	Normal	PEO; KSS?
S7	29A	CI (29%); CIV (35%)	CM
S8	4A	CIV (38%)	Envolvimento multissistémico
S9	39A	CI (37%); CII (15%); CIV (36%)	CM
S10	2M	CI (38%)	Apneias recorrentes; paragem respiratória; hipotonia
S11	14A	CI (30%); CII (23%); CIV (30%)	Rabdomiólise c/ necessidade de ventilação
S12	1A	CIV (31%)	Encefalopatia convulsiva
S13	12A	ND (Sangue)	Síndrome de Pearson
S14	69A	Normal	Ptose
S15	1M	CI (40%)	Falência multiorgânica; Insuficiência hepática; renal;
S16	63A	Normal	RRFs
S17	1A	CI (24%)	Atraso de desenvolvimento
S18	41A	Normal	Ptose
S19	23A	CI (37%)	Fraqueza muscular; episódios de rabdomiólise
S20	2A	CI (40%)	ADPM; hidrocefalia
S21	8M	CI (42%); CII (25%); CIV (38%)	Cardiomiopatia; hiperlactacidemia
S22	8A	Normal	Miosite de repetição; CK↑ persistente
S23	31A	Normal	Ptose; psicose
S24	21A	ND (Sangue)	Síndrome de Pearson
S25	68A	Normal	Miopatia mitocondrial; ptose, diplopia
S26	56A	CII(20%); CIV (40%)	PEO, ptose, tetraparésia, CK↑, miopatia
S27	71A	Normal	KSS
S28	34A	Normal	PEO
S29	15A	Normal	KSS; fraqueza muscular progressiva; mialgias; hiperlactacidemia; insuficiência respiratória; arritmia
S30	16A	Normal	ADPM; síndrome cerebelosa; lesão isquémica
S31	53A	Normal	PEO
S32	31A	Normal	PEO; estrabismo; ptose; CK↑
S33	66A	CI (23%); CIV (39%)	PEO; RRFs
S34	57A	Normal	PEO; ptose; tetraparésia
S35	5A	Normal	Miopatia
S36	67A	Normal	Miopatia; hiperlactacidemia; fadiga; RRFs

PEO – oftalmoplegia externa progressiva; RRFs - Fibras vermelhas e rotas; KSS – Síndrome de Kearns-Sayre; ADPM - Atraso de Desenvolvimento Psicomotor; CK - Creatina quinase

Tabela 2 – Doentes com pesquisa de deleções e sequenciação do mtDNA completo

Paciente	Idade	CRM	Sintomas e sinais
MT1	7A	CIV (37%)	Miosite
MT2	1M	Normal	Espasticidade; ventilação assistida; MRI: atingimento encefálico e tronco cerebral
MT3	2A	CI(21%); CIV(36%)	ADPM; hiperlactacidemia
MT4	1M	CIV (33%);	Hipotonia
MT5	59A	Normal	Fadiga; fraqueza muscular proximal/ RRFs e fibras COX-
MT6	9M	CI (39%)	Atraso de desenvolvimento; microcefalia; má evolução
MT7	44A	CI (27%)	Síndrome piramidal bilateral; ataxia
MT8	7A	CIV (35%)	CM
MT9	28A	CI (43%); CII (28%); CII+III-0.9	Distrofia das cinturas; face miopática
MT10	60A	CII (17%); CIV (37%); CII-III (0.9)	Diabetes; diplopia; ataxia da marcha; disartria; disfagia; hipersinal em T2 caudado: NARP- <i>like</i> ?
MT11	38A	CIV(36%)	Miopatía/ alterações miopáticas e desnervação
MT12	3A	CI (38%);	Epilepsia mioclónica de difícil controlo
MT13	1A	CIV (40%)	Acidose metabólica; alt. Neurológicas; alterações hepáticas e renais; hiperlactacidemia
MT14	12A	CI (16%); CII (15%); CIV(28%)	CK↑ persistente
MT15	31A	Normal	Leucoencefalopatia/RRFs
MT16	59A	CI (35%);	Ptose bilateral; MRI: calcificações dos gânglios da base
MT17	90A	CI (26%), CII (29%)	Cefaleias; deterioração de linguagem; hemiparésia direita; RMN: alterações da substância branca
MT18	17A	CI (10%), CII (7%), CIV(8%)	Miopatía
MT19		CI (35%)	Surdez Neurosensorial; movimentos coreicos
MT20	69A	CI (27%); CII (13%); CII+III- 0.6	Miosite inflamatória
MT21	1A	CIV (39%)	Epilepsia mioclónica; regressão do desenvolvimento
MT22	4M	CI (37%); CIV (18%)	Disfunção hepática; hiperlactacidemia
MT23	5A	CI (36%)	Distonia; suspeita de Síndrome de Leigh Lactato e piruvato aumentados no LCR

MRI - Ressonância magnética; ADPM - Atraso de Desenvolvimento Psicomotor; RRFs - Fibras vermelhas e rotas; PEO - Oftalmoplegia Externa Progressiva; CK - Creatina quinase; LCR – Líquido cefalorraquidiano.

3.2 Métodos

3.2.1 Extracção de DNA

3.2.1.1 Extracção automática de DNA de sangue total

O DNA foi obtido por extracção automática no aparelho Bio Robot EZ1 (QIAGEN), utilizando o *kit* EZ1 DNA Blood 350 µL (QIAGEN), específico para a extracção de DNA a partir de sangue total. Na utilização deste *kit* foi seguido o protocolo indicado pelo fabricante.

3.2.1.2 Extracção de DNA a partir de biópsia muscular

O DNA total foi isolado por extracção orgânica a partir de músculo esquelético. Utilizaram-se substâncias desproteinizantes, capazes de desnaturar e retirar as proteínas que estão acopladas ao DNA; a adição posterior de Isopropanol permite que o material genético precipite formando um *pellet*, que deverá ser hidratado para posterior utilização.

A. Preparação da amostra

Triturar aproximadamente 20 mg de músculo congelado a -70 °C. Também podem ser utilizados os *pellets* dos homogeneizados usados para o estudo enzimático da CRM. Durante a manipulação manter o músculo em gelo.

B. Lise celular

- 1- Colocar o músculo previamente triturado ou o homogeneizado num *ependorf* de 1,5 mL.
- 2- Adicionar 500 µL de *Cell Lysis Solution* e homogeneizar, utilizando uma vareta de vidro e vortex.
- 3- Adicionar 3 µL de *Proteinase K Solution* (20 mg/mL). Misturar, invertendo o tubo várias vezes.
- 4- Incubar a 55°C durante a noite, até a solução se tornar homogénea.

C. Tratamento com RNase

- 1- Juntar 3 µL de *RNase Solution* (4 mg/mL) à amostra lisada.
- 2- Misturar a amostra invertendo o tubo várias vezes e incubar a 37°C durante 15 a 60 minutos.

D. Precipitação das proteínas

- 1- Arrefecer a amostra à temperatura ambiente.
- 2- Adicionar 200 µL de *Protein Precipitation Solution* à amostra tratada.
- 3- Agitar no vortex durante 20 segundos e de seguida colocar no gelo 5 minutos.

4- Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos, a 4°C. O precipitado de proteínas forma um fino *pellet*. Caso não se observe esse precipitado repetir os passos 3 e 4.

E. Precipitação do DNA

1- Transferir o sobrenadante, com uma pipeta, que contém o DNA para um *ependorf* de 1,5 mL contendo 600 µL de Isopropanol 100%.

2- Inverter o tubo lentamente várias vezes.

3- Centrifugar a 14000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C.

4- Rejeitar o sobrenadante e secar o *pellet*.

5- Adicionar 600 µL de Etanol 70% e inverter o tubo várias vezes para ressuspender o DNA.

6- Centrifugar a 14000 rpm, durante 1 minuto, a 4°C.

7- Decantar o etanol cuidadosamente, invertendo o tubo, de forma a não perder o *pellet*.

8- Deixar à temperatura ambiente o tempo suficiente para secar.

F. Hidratação do DNA

1- Adicionar 20 a 50 µL de *DNA Hydration Solution*, de acordo com o rendimento obtido.

2- Incubar a 65°C durante 1 hora ou durante a noite à temperatura ambiente, para completar a rehidratação.

Armazenar o DNA a 2-8°C ou de -20°C a -80°C.

A determinação da concentração (ng/µL) e da pureza do DNA total foi obtida por quantificação no aparelho NanoDrop® ND-1000 *UV-Vis Spectrophotometer*.

3.2.2 Southern-Blotting

O método de *Shouthern-Blotting* foi utilizado para a pesquisa de deleções simples ou múltiplas do mtDNA.

A. Digestão do DNA com enzima de restrição

Colocar em *ependorfs* de 1,5 mL:

H ₂ O	*
<i>Buffer</i> 10 x (Kit)	3 µL
RNase	1 µL
DNA	*
PvuII	1 µL

Centrifugar e colocar no banho a 37 °C durante 1h.

* Nota: Quantidade de H₂O de acordo com quantidade de DNA usada (entre 3 a 10 µL, 100-200 ng/ µL), tendo em conta que se deve ter um volume final de 30 µL.

B. Testar a digestão

Num gel de agarose a 1% (1 g de agarose para 100 mL de TAE 1x, com Brometo de etídio)

Amostras	5 µL DNA digerido
	+
	2 µL <i>Dye</i>
Marcador λ/HindIII	1,2 µL M
	+
	1,8 µL H ₂ O
	+
	2 µL <i>Dye</i>
Uncut	1 µL DNA
	+
	2 µL <i>Dye</i>

Correr o gel a 100V, durante 15 min.

C. Electroforese em gel de agarose 1%

Preparar 300 mL de agarose a 1% e colocar no suporte adequado. Aplicar de acordo com a tabela,

Amostras	25 µL DNA
	+
	4 µL <i>Dye</i>
Marcador λ/HindIII	1,2 µL M
	+
	1,8 µL H ₂ O
	+
	2 µL <i>Dye</i>
Uncut	5 µL DNA
	+
	1,8 µL H ₂ O
	+
	2 µL <i>Dye</i>

Correr o gel a 30V durante a noite.

D. Desnaturação e neutralização do gel

- 1- Fotografar o gel.
- 2- Cortar o gel com as medidas da membrana (10 cm x 15 cm) e o canto superior direito.
- 3- Passar o gel do transiluminador para uma tina de vidro com água destilada.
- 4- Agitar um pouco e rejeitar a água.
- 5-Adicionar tampão de desnaturação (ver ANEXO II). Deixar durante 30 minutos num agitador de rolos.
- 6- Retirar tampão de desnaturação e colocar o tampão de neutralização (ver ANEXO II). Agitar durante 30 minutos, num agitador de rolos.

E. Transferência

- 1- Preparar uma tina com papel de filtro Whatman 3 MM embebido em tampão SSC 10x (300 mL SSC 20 x + 300 mL H₂O destilada).
- 2- Colocar o gel invertido numa película e transferi-lo para a tina previamente preparada.
- 3- Embeber uma membrana de *nylon* (*Zeta-Probe^R GT Genomic Tested Blotting MemBranes – BioRad*) com tampão SSC 10x.
- 4- Colocar a membrana imediatamente acima do gel invertido.
- 5- Colocar folhas de papel de filtro Whatman, com o mesmo tamanho da membrana.
- 6- Tapar com parafilme de lado, de forma a evitar a evaporação.
- 7- Colocar folhas de papel absorvente por cima e um peso com aproximadamente 1Kg.
- 8- Deixar durante a noite.

F. Secagem da membrana

- 1- Remover, cuidadosamente, a membrana do gel e colocar em papel Whatman para secar, durante algumas horas.

Lavar o frasco de hibridização e rejeitar:

1x Etanol absoluto

3x Água (secar totalmente no forno a 55 °C)

G. Pré-hibridização/Hibridização

Foi utilizado o método de marcação com fluorescência, através do *kit* de Hibridização e Detecção – *Amersham Gene ImagesTM AlkPhos DirectTM Labelling and Detection System* (GE Healthcare).

- 1- Ligar o forno a 55 °C e o banho fervente.
- 2- Descongelar o tampão de pré-hibridização (sem sonda) (ver ANEXO II) e a sonda.
- 3- Aquecer o tampão de pré-hibridização a 55 °C, aproximadamente 20 min.
- 4- Colocar a membrana no frasco de hibridização.
- 5- Adicionar o tampão de pré-hibridização previamente aquecido, durante 15 min a 55 °C no forno rotativo. (Nota: Reaproveitar o tampão de pré-hibridização e congelar a -20 °C.)
- 6- Desnaturar a sonda em banho fervente, durante 5 min e colocar imediatamente em gelo.
- 7- Adicionar a sonda ao frasco de hibridização e hibridizar durante a noite, a 55 °C em forno rotativo. (Nota: Recuperar a sonda e congelar a -20 °C).

H. Lavagem da membrana/Revelação

- 1- Aquecer o *Wash Buffer 1* (ver ANEXO II) a 55 °C, durante aproximadamente 15 min.
- 2- Lavar duas vezes com *Wash Buffer 1*, enchendo o frasco de hibridização, durante 10 min de cada vez, a 55 °C, no forno rotativo.
- 3- Lavar duas vezes com *Wash Buffer 2 (Working dilution – ver ANEXO II)*, enchendo o frasco de hibridização, 5 min de cada vez, no forno rotativo, à temperatura ambiente.
- 4- Tirar a membrana do tubo com a ajuda da pinça e escorrê-la num papel de filtro.
- 5- Colocar a membrana sobre um plástico e impregná-la com 5 mL de solução de revelação (CDP-*Star*[™]), durante 5 min.
- 6- Envolver a membrana num plástico e colocá-la numa cassete de revelação (Hypercassette[™] Amersham LIFE SCIENCE), esticando bem para evitar bolhas de ar.
- 7- Numa sala escura, colocar a película fotográfica na cassete.
- 8- Deixar 2 horas à temperatura ambiente.
- 9- Para revelar, inserir a película no aparelho Fujifilm FPM-100^a.

3.2.3 Pesquisa de deleções por PCR

As deleções detectadas pela técnica de *Southern-Blotting* foram confirmadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

A. PCR de Amplificação e respectiva análise

Foi amplificado um fragmento de ~8000 pb localizado entre os nucleotídeos 7433 e 15600 do mtDNA. Para a reacção de amplificação foi utilizada a mistura comercial *ImmoMix Red 1X - Bioline* (contendo DNA polimerase IMMOLASE[™], (NH₄)₂SO₄, Tween 20, MgCl₂, dNTPs e tampão Tris-HCl)

e os *primers* (*Forward* e *Backward*) a uma concentração de 50 pmol/ μ L. Foi utilizada 12,5 μ L de *ImmoMix Red* à qual foi adicionada 0.25 μ L de cada *primer*, 0.5 μ L de DNA e água para um volume final de 25 μ L. O programa de amplificação incluiu uma desnaturação inicial de 5' à 94°C, 25 ciclos à 94°C/1', 65°C/2', 72°C/3', e uma extensão final de 10' a 72°C.

Os produtos de PCR (10 μ L) e o marcador λ /HindIII foram aplicados num gel de agarose a 1% e sujeitos a uma electroforese durante cerca de 3 horas a 85V. O gel foi visualizado num transiluminador de luz ultra-violeta e as bandas analisadas.

3.2.4 Sequenciação parcial do mtDNA

A sequenciação parcial do mtDNA envolveu os genes *MTRNR1*, *MTTL1*, *MTND1*, *MTTLI*, *MTTS1*, *MTTK*, *MTATP6*, *MTTG*, *MTND4*, *MTND5*, *MTND6*.

A. PCR de amplificação

Para a amplificação destes genes foram utilizados vários pares de primers que abrangem igualmente as regiões flanqueadoras (Tabela 3). Foi adicionada a todos os primers uma “cauda” M13F e M13B para facilitar a realização do *PCR* de sequenciação, já que permite a utilização de um *primer* universal para todos os fragmentos. As condições das reacções de amplificação são semelhantes às referidas anteriormente. O programa de amplificação utilizado para todos os fragmentos incluiu uma desnaturação inicial durante 5' à 94°C, 35 ciclos à 94°C/30'', 61°C/45'' e 72°C/2', e uma extensão final durante 5' a 72°C.

Tabela 3 - Sequências dos *primers* utilizados para a sequenciação parcial do mtDNA.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
MTRNR1	1F - CTCCTCAAAGCAATACACTG	510
	1B - GGGCTAAGCATAGTGGGGTA	
	2F - ACGAAAGTGGCTTTAACAT	439
	2B - GTTCAACTAAGCACTCTA	
	3F - CGATCAACCTCACCACCTCT	800
	3B - TGGACAACCAGCTATCACCA	
MTTL1	9F - TACTTCACAAAGCGCCTTCC	425
	9B - GGGAGGGGGTTCATAGTAG	
MTND1	10F - CCTAAAACCCGCCACATCTA	495
	10B - ATGAAGAATAGGGCGAAGGG	
	11F - TGGCTCCTTTAACCTCTCCA	514
	11B - AAGTAACTCTTTATCAGAC	
MTTI	12F - CTACCACTCACCTAGCATTAC	494
	12B - AAGGATTATGGATGCGGTTG	
MTTS1	22F - TAATAGTAGAAGAACCCTCC	319
	22B - GAGGGCGTGATCATGAAAGGTG	
MTTK	25F - TTTTCATGCCCATCGTCTAGA	617
	25B - TGGGTGGTTGGTGTAATGA	
MTATP6	26F - TTTCCCTCTATTGATCCC	815
	26B - GTGGCCTTGGTATGTGCTTT	
MTTG	29F - CTTTGGCTTCGAAGCCGCGCC	248
	28B - TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT	
MTND4	31F - GCCATACTAGTCTTTGCCGC	448
	31B - TCTGTGGCTGTGAATGTTAT	
	32F - CAACGCCACTTATCCAGTGAA	514
	32B - GGTTGAGAATGAGTGTGAGGC	
	33F - TTTCACTCTACTGCCCAAGAA	800
	33B - GGAGAATGGGGGATAGGTGT	
	34F - CATTCTCATAATCGCCACG	398
	34B - GGAGAATGGGGGATAGGTGT	
	35F - TATCACTCTCTACTTACAG	530
	35B - GCGACAATGGATTTTACA	
MTND5	39F - ACATCTGTACCCACGCTTCTT	560
	39B - TTTTATTTTAAGTTTGTGG	
MTND6	41F - TATCTAGGCCTTCTTACGAG	370
	41B - TTGAGGAGTATCCTGAGGCA	
	42F - CCACTAAAACACTCACCAAG	627
	42B - AGAATATTGAGGCGCCATTG	

Abreviaturas: F (*Forward*)- refere-se à sequência nucleotídica da cadeia orientada de 5' → 3' e B (*Backward*) – à sequência nucleotídica da cadeia complementar; Todas as sequências são precedidas das respectivas caudas: M13F -TGTAACGACGGCCAGT e M13B – CAGGAAACAGCTATGACC.

B. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados pelo método enzimático *ExoSap* IT® para remover o excedente de *primers* e nucleotídeos. A cada 2,5 µL de produto de PCR adicionou-se 1 µL de *Exosap* e incubou-se 15 minutos a 37°C, e a seguir 15 minutos a 80°C para inativação das enzimas.

C. Reacção de sequenciação

As reacções de sequenciação foram preparadas segundo o protocolo do *kit Big Dye Terminator v.1 Cycle Sequencing Mix (Applied Biosystem)*. A reacção com um volume final de 10 µL incluiu 1 µL de *Big Dye* (que contém MgCl₂, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos e *AmpliTaq DNA polimerase*), 0.5 µL de *primer* M13 a 5 pmol/µL (*F* ou *B*) e 3.5 µL de produto de PCR purificado. As condições do programa de sequenciação incluíram uma desnaturação inicial de 2' a 94°C, 25 ciclos à 94°C/10'', 50°C/6'' e 60°C/4''.

D. Purificação dos produtos de sequenciação

De forma a eliminar os dNTPs não incorporados e sais que podiam interferir com a electroforese os produtos de sequenciação foram purificados através de colunas contendo 750 µL de *Shephadex G-50 (Amersham Biosciences)*. Centrifugaram-se a 4400 rpm durante 4 minutos.

E. Electroforese capilar

Os produtos purificados foram ressuspensos em 15 µL de formamida desionizada, (substância desnaturante) *Hi-Di™ (Applied Biosystem)*, por agitação no vortex e deixando dissolver durante 10 minutos.

A separação dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático *ABIPRISM 3130XL (Applied Biosystems)*. Os resultados foram analisados por comparação com a sequência de referência do mtDNA (NC_012920).

3.2.5 Sequenciação do mtDNA completo

Para a sequenciação do mtDNA completo foi utilizado um kit, *VariantSEQR™ Resequencing System - Applied Biosystems®*, composto por 46 pares de *primers* desenhados para promover a amplificação selectiva de distintos fragmentos do genoma mitocondrial.

Para cada gene mitocondrial existe um *VariantSEQR Resequencing Set (RRS)*, e cada RRS inclui um ou mais pares de *primers* desenhados para esse gene. Cada par de *primers* constitui um *resequencing amplicon (RSA)*. Cada RSA inclui ambos os *primers Forward (3'-5')* e *Backward (5'-3')*. Estes *primers* possuem uma cauda de sequenciação universal, para os *primers M13-Forward* e *M13-Backward* respectivamente, simplificando assim as reacções de sequenciação. Para a sequenciação do genoma mitocondrial completo, são assim necessários 46 RSA's, que delimitam 46 fragmentos do mtDNA (Tabela 4).

Tabela 4 – Identificação dos RSAs e correspondentes genes do genoma mitocondrial amplificados.

Fragmento	RSA	Genes amplificados
1	145148	RNA12S; tRNAVal; RNA16S
2	145163	RNA16S
3	145139	RNA16S
4	145117	RNA16S
5	145118	RNA16S; tRNALeu ^(UUR) ; ND1
6	145119	ND1
7	145120	ATP6; COX3
8	145121	ND4L; ND4
9	145122	ND4
10	145172	ND5
11	145242	ND5
12	145173	ND5; ND6
13	145243	ND6; tRNAGlu; CYB
14	145205	CYB; tRNAThr
15	145177	CYB
16	145178	CYB; tRNAThr
17	145244	ATP6; COX3
18	145245	ND4; tRNAHis; tRNA ^(UGA) ; tRNALeu ^(CUN) ; ND5
19	145967	RNA12S; tRNAVal; RNA16S
20	145246	ND6; tRNAGlu; cit b
21	145184	RNA12S
22	145185	HVS2
23	145124	tRNALeu ^(UUR)
24	145137	ND1
25	145188	tRNAMet; ND2; tRNATrp
26	145189	tRNA ^(GUU) Asp; tRNACys; tRNATyr; COX1
27	145247	COX1
28	145125	COX2; tRNALys; ATP8; ATP6
29	145126	ATP6
30	145192	COX3; tRNAGly
31	145193	COX3; tRNAGly; ND3
32	145138	ND4
33	145127	ND4
34	145196	ND5
35	145128	ND2; tRNATrp
36	145248	tRNAPhe; RNA12S
37	145129	ND1; tRNAIle
38	145140	ND2

39	145130	COX1
40	145131	COX1
41	145132	COX2
42	145142	ND3; tRNAArg; ND4L
43	145252	ND5
44	145250	HVS2
45	145161	tRNAPro; D-Loop;
46	145241	COX1; tRNA ^(UCN) Ser; tRNAAsp; COX2

PCR de amplificação

Para a reacção de *PCR* foi utilizada 7,5 µL de *ImmoMix Red* à qual foi adicionada 2,4 µL de glicerol (*Ultrapure™ Glycerol – Invitrogen*), 3 µL de cada RSA (1,2 pmol/µL), 0,5 µL de DNA e água para um volume final de 15 µL. As condições do programa de amplificação incluíram uma desnaturação inicial durante 5' a 96°C, e 40 ciclos a 94°C/30'', 60°C/45'' e 72°C/45'', e uma extensão final durante 10' a 72°C.

A seguir procedeu-se como especificado nos pontos B a E da sequencição parcial do mtDNA.

3.2.6 RFLP

A técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) foi utilizada para pesquisar as mutações m.3243A>G; m.3302A>G; m.8342G>A; m.8993T>C; m.9176T>C; m.9185T>C; m.11778G>A; m.13289G>C e m.13513A>G. Os primers para amplificar os correspondentes fragmentos bem como as enzimas de restrição e respectivo padrão de bandas são apresentados a seguir (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequências dos primers e enzimas de restrição utilizados no RFLP, e correspondente padrão de bandas.

Mutação	Gene	Sequências dos <i>Primers</i>	Enzima de restrição	Padrão de bandas (pb)
m.3243A>G	<i>MTTL1</i>	F - CCTCCCTGTACGAAAGGAC B - GCGATTAGAATGGGTACAATG	Hae III GG↓CC	238: 169 (97,72), 37,32
m.3302A>G	<i>MTTL1</i>	F - CCTCCCTGTACGAAAGGAC B - GCGATTAGAATGGGTACAATG	Dde I C↓TNAG	238: 161 (106,55), 77
m.8342G>A	<i>MTTK</i>	F - TTTCATGCCCATCGTCTAGAATTA B - GTATTTAGTTGGGGCATTCTACTGTAAAGAGGTGAAGGTT	XmnI GAANN↓NNTTC	183: 159 (121,38), 24
m.8993T>G	<i>MTATP6</i>	F - CCTAGCCATGGCCATCCCCGTA B - GGCTGAGAGGGCCCCCTGTTAGG	Msp I C↓CGG	449: 449 (285,164)
m.9176T>C	<i>MTATP6</i>	F - GCCCTAGCCAC TTCTTAC B - GTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGCTTCTCT	ScrF I CC↓NGG	308: 211 (184,27), 97
m.9185T>C	<i>MTATP6</i>	F - ACGTTTTACACTTCTAGTGGGCC B - AGAGGGCCCTGTAAAGGCCTC	Apa I GGGCC↓C	113: 113 (89,24)
m.11778G>A	<i>MTND4</i>	F - CCAAACCCCTGAAGCTTCACCGGCAG B - GGGTTAACGAGGGTGGTAAGG	Mae III ↓GTNAC	745: 451,238 (131,107), 57
m.13289G>C	<i>MTND5</i>	F - TGTAAAACGACGCCAGTCAGCAGGCAAATCAGCCCAA B - CAGGAAACAGCTATGACCTCGATGTGGTCTTTGGA	SfaNI GCATCN5↓	550: 550 (324,246)
m.13513A>G	<i>MTND5</i>	F - CCTCAGGTTTCTACTCCGAA B - CGAGTGCTATAGGCGCTT	BbsI GAAGACN2↓N6	119: 119 (92,27)

Os nucleotídeos a **bold** representam *mismatches* utilizados para criar locais de reconhecimento; estes estão indicados por baixo de cada uma das enzimas de restrição; os tamanhos de bandas apresentados a vermelho correspondem ao padrão positivo.

As condições do programa de amplificação para todos os fragmentos incluíram uma desnaturação inicial de 5' a 95°C, 30 ciclos a 94°C/30''; 60°C/30''; 72°C/30'', e uma extensão final de 5' a 72°C.

3.2.7 Bioinformática

O desenho dos *primers* de cada gene foi efectuado no programa **Primer3** e no **FastPCR** o que permitiu a previsão da qualidade dos primers, bem como a temperatura de *annealing* mais apropriada e a exclusão da possível formação de dímeros.

A base de dados **MITOMAP** (*Human Mitochondrial Genome Database* - <http://www.mitomap.org>) foi consultada para aceder: as mutações descritas e respectiva classificação salvaguardando que não é disponibilizada uma análise definitiva sobre o efeito de cada uma das alterações; a rCRS (*Revised Cambridge Reference Sequence*) do mtDNA anotada; as sequências do mtDNA de outras espécies disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); a localização e função de cada um dos genes bem como regiões não codificantes e respectivas abreviaturas; ao código genético do mtDNA humano e a árvore filogenética das variações do mtDNA humano.

A base de dados **mtDB** (*Human Mitochondrial Genome Database* - <http://www.mtddb.igp.uu.se/>) disponibiliza 2704 genomas mitocondriais humanos (completos ou regiões codificantes) e informação relativa aos numerosos polimorfismos descritos, constituindo um recurso relevante para a investigação médica e genética populacional.

A base de dados **HGMD** (*Human Gene Mutation Database* - <http://www.hgmd.org/>) foi consultada para aceder as mutações patogénicas descritas nos genes nucleares abordados neste trabalho.

Para as mutações *missense* detectadas nos genes estruturais, a conservação dos respectivos aminoácidos foi avaliada de acordo com o descrito por Ruiz-Pesini e colegas (Ruiz-Pesini *et al.* 2004). O índice de conservação (CI - *Conservation Index*) corresponde a percentagem de espécies que possuem a sequência normal entre 39 diferentes espécies (12 primatas; 22 outros mamíferos; 4 representativas de outros vertebrados; uma de invertebrados). O alinhamento das sequências seleccionadas foi depois efectuado no **CLUSTALW2** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Adicionalmente, para as alterações detectadas nos genes dos tRNAs a conservação dos respectivos nucleotídeos entre mamíferos (MCI - *Mammalian Conservation Index*) foi avaliada recorrendo a base de dados **Mamit-tRNA** (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr/>) que dispõe de uma compilação dos genes dos tRNAs mamíferos.

As mutações missense foram igualmente submetidas à análises bioinformáticas nos programas **PolyPhen** (*Polymorphism Phenotyping* - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e **SIFT** (*Sorting Intolerant From Tolerant* - <http://sift.jcvi.org/>).

No PolyPhen cada mutação é avaliada qualitativamente, como benigna, possivelmente patogénica ou provavelmente patogénica com base nos limiares de expressão das taxas de falsos positivos (FPR – *False Positive Rate*). As mutações associadas com FPRs iguais ou inferiores a 5% são previstas como sendo provavelmente patogénicas, com FPRs iguais ou inferiores a 10% como possivelmente patogénicas, e com FPRs acima dos 10% como benignas. O modelo *HumDiv* é utilizado para avaliar alelos raros em *loci* potencialmente envolvidos em fenótipos complexos e na análise da selecção natural em que mesmo alelos moderadamente deletérios deverão ser tratados como patogénicos.

O SIFT baseia-se no facto da evolução proteica estar associada a função proteica. As posições com probabilidades normalizadas inferiores a 0,05 são previstas como sendo deletérias e às superiores ou iguais a 0,05 como toleradas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 Resultados e discussão

4.1 Algoritmo

Como pudemos constatar as CM são doenças extremamente complexas, com uma elevada heterogeneidade clínica e genética o que dificulta significativamente o seu diagnóstico. Este deverá começar pela avaliação clínica e os estudos metabólicos e de imagiologia. Quando a suspeita de CM está estabelecida, a orientação do estudo não é na maioria dos casos evidente. Nas últimas décadas vários critérios foram desenvolvidos no sentido de auxiliar no diagnóstico das CM. Walker e colegas foram os primeiros a propor um conjunto de critérios *minor* e *major* para a identificação destas doenças (Walker *et al.* 1996). Vários anos depois, Bernier *et al.* propuseram modificações para a avaliação das crianças (Bernier *et al.* 2002). Outra proposta é o sistema de *scores* do Centro Nijmegen para as citopatias mitocondriais e os critérios para o diagnóstico de CM em crianças (Thorburn & Smeitink, 2001; Wolf & Smeitink, 2002). Todos assentam numa combinação dos achados clínicos, laboratoriais, patológicos e bioquímicos. Estes critérios envolvem os resultados obtidos através de estudos que não estão disponíveis em todos os laboratórios e não incluem uma orientação para o estudo molecular. O diagnóstico molecular é muitas vezes fundamental para a confirmação do diagnóstico de CM e poderá permitir o aconselhamento genético e eventualmente o diagnóstico pré-natal. Um dos objectivos deste trabalho foi elaborar um algoritmo para o estudo molecular das CM com o intuito de auxiliar todos os profissionais que estão envolvidos no diagnóstico destas doenças, tendo em conta os recursos disponíveis.

Após uma suspeita clínica de CM estar estabelecida será necessário decidir qual a abordagem a seguir e em que tipo de tecido. O tecido mais indicado para o estudo destas doenças é o muscular mas nem sempre é considerado pelo facto de envolver uma técnica invasiva e dolorosa. Assim o algoritmo compreende abordagens em sangue e em biópsia muscular. Como foi referido anteriormente os fenótipos apresentados pelas crianças e adultos são diversos e estima-se que a causa genética nas crianças seja essencialmente de origem nuclear. O guia de orientação apresentado a seguir também inclui esta distinção (Figura 19). Perante uma suspeita de CM mas que não se enquadra em nenhuma síndrome clássica ou fenótipo bem definido, a abordagem em sangue será inicialmente orientada para a pesquisa de mutações no mtDNA nos genes em que está descrito o maior número de mutações patogénicas e que incluem o *MTTL1*, *MTTK* (tRNA^{Leu} e tRNA^{Lys}) e o *MTATP6* (ATPase6).

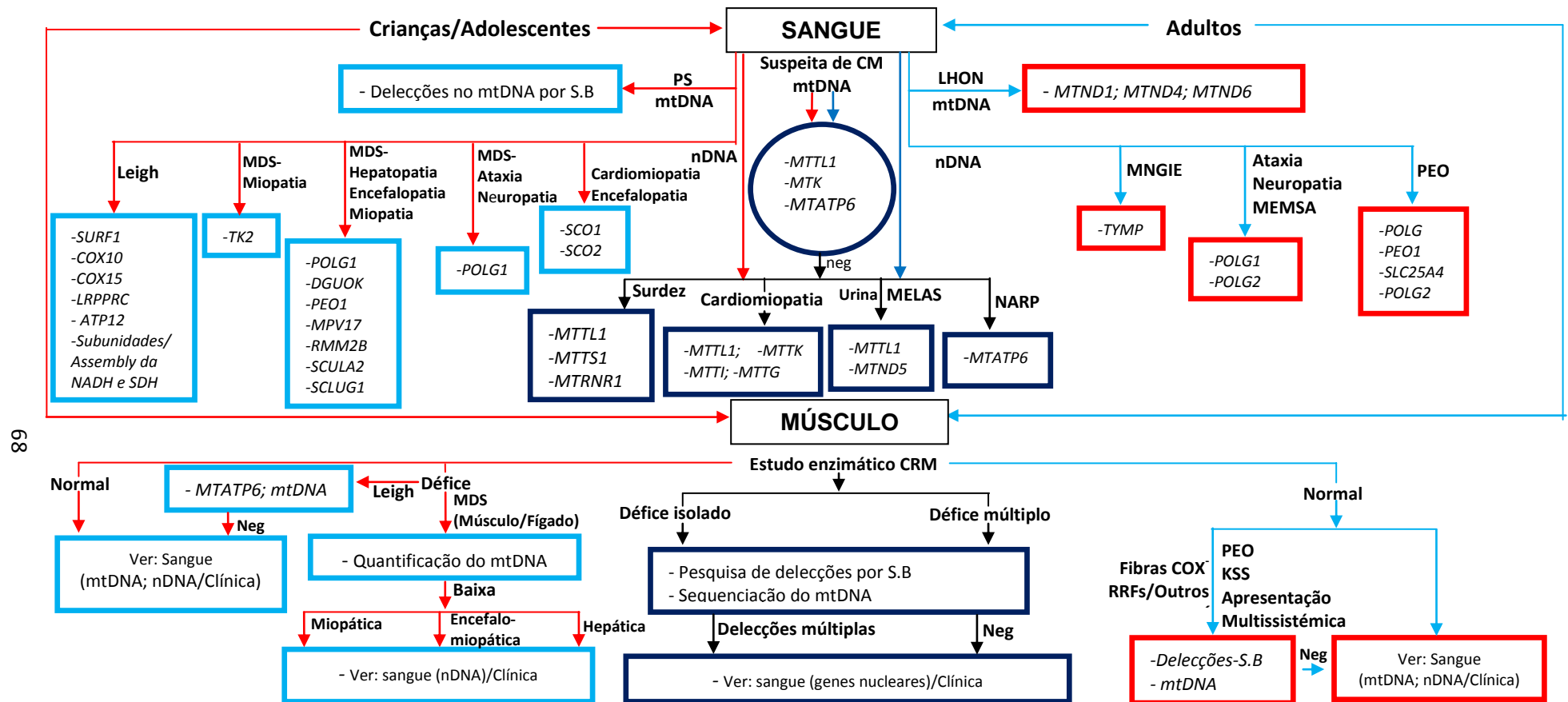


Figura 19 – Algoritmo para a abordagem genética das CM.

Perante uma síndrome clássica ou fenótipo isolado serão pesquisados os genes mitocondriais que contêm as mutações mais frequentemente associadas a cada uma das apresentações (ver algoritmo).

A investigação do DNA nuclear é particularmente importante nas crianças e deverá ser efectuada em sangue já que o material obtido a partir da biópsia muscular deverá ser reservado para o estudo do mtDNA. No ANEXO III estão tabelas que contêm um sumário dos genes nucleares em que foram até à data descritas mutações patogénicas, bem como os fenótipos a que geralmente estão associadas e as referências dos respectivos artigos de revisão.

A investigação em biópsia muscular é feita em função do estudo bioquímico, achados histológicos e apresentação clínica. A identificação de um défice enzimático da CRM levará a pesquisa de deleções que, se for negativa deverá ser seguida da sequenciação completa do mtDNA. Se a pesquisa destes rearranjos permitir detectar uma deleção simples então o estudo estará finalizado, mas na presença de deleções múltiplas poderão ser estudados os genes nucleares em função da clínica como especificado para o sangue. Este complemento do estudo é relevante já que a identificação da causa genética num gene nuclear permitirá um melhor aconselhamento genético e possibilitará o diagnóstico pré-natal. Dispondo de biópsia muscular e/ou hepática e quando existe uma suspeita de síndrome de depleção (MDS) deverá proceder-se a quantificação do mtDNA. Se se verificar uma diminuição na quantidade de mtDNA deverá então prosseguir-se o estudo com a pesquisa de mutações no nDNA em função da clínica como especificado para o sangue. Se os estudos efectuados em biópsia muscular forem negativos mas existir uma forte suspeita clínica de CM poderá proceder-se ao estudo molecular em função da clínica como referido para o sangue.

Agumas das vias que envolvem o estudo do mtDNA foram já utilizadas nestes últimos anos no laboratório de Biologia Clínica do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, outras foram abordadas ao longo deste trabalho. Os resultados obtidos através dessa investigação serão apresentados a seguir e incluem: o estudo molecular do mtDNA efectuado por rotina quando perante uma suspeita de CM, e nalguns casos a pesquisa de deleções e a sequenciação do mtDNA completo; a pesquisa de mutações associadas as síndromes MELAS e LHON; e aos fenótipos de surdez neurosensorial e cardiomiopatia.

4.2 Estudo do DNA mitocondrial

Os resultados do estudo genético do DNA mitocondrial incluem a identificação e discussão: (i) das mutações pontuais patogénicas descritas, (ii) das mutações pontuais com patogenicidade não esclarecida; (iii) das mutações pontuais não descritas; (iiii) e dos rearranjos patogénicos. Foram igualmente detectados numerosos polimorfismos já descritos bem como novas alterações sinónimas, mas não serão discutidos no âmbito deste trabalho.

O estudo molecular do mtDNA efectuado por rotina, ou seja, o que envolveu a sequenciação dos genes *MTTL1*, *MTTK* e *MTATP6* foi efectuado num total de 546 doentes com suspeita de citopatia mitocondrial nos quais foram detectadas: sete mutações pontuais patogénicas descritas, 9 mutações não esclarecidas e 17 mutações não descritas. A pesquisa de deleções por *Southern-Blotting* revelou deleções simples em três dos 59 doentes estudados. Adicionalmente foi sequenciado o mtDNA completo em 23 destes doentes, tendo sido identificadas 3 mutações patogénicas, 9 não esclarecidas e 6 não descritas. Nos 112 doentes com suspeita de MELAS foram sequenciados os genes *MTTL1* e *MTND5*, em que foram identificadas duas mutações pontuais patogénicas descritas, 6 mutações não esclarecidas e uma não descrita. A sequenciação dos genes *MTND1*, *MTND4* e *MTND6* nos 95 doentes com suspeita de LHON permitiu a identificação de uma mutação patogénica, 8 mutações não esclarecidas e duas mutações não descritas. Os genes *MTRNR1*, *MTTL1* e *MTTS1* foram estudados em 31 casos com surdez em que foram identificadas uma mutação patogénica e duas mutações não esclarecidas. A presença de cardiomiopatia em 38 doentes orientou o estudo molecular para a sequenciação dos genes *MTTL1*, *MTTK*, *MTTI* e *MTTG*, tendo possibilitado a detecção de uma mutação patogénica, 6 mutações não esclarecidas e uma não descrita.

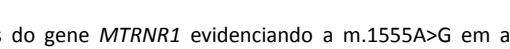
4.2.1 Mutações pontuais patogénicas descritas

As mutações patogénicas descritas referem-se a mutações que constam na base de dados MITOMAP como mutações associadas a doença, com a classificação "Cfrm" (descritas como patogénicas por dois ou mais grupos independentes) ou "reportadas" (descritas como possivelmente patogénicas numa ou mais publicações). No total foram detectadas 13 diferentes mutações patogénicas descritas num total de 23 doentes (Tabela 6).

Tabela 6 – Mutações pontuais patogénicas descritas.

Paciente	Idade	M/S	CRM	Sintomas e sinais	Mutação	Gene	Homo/Hetero	Referência
SN1	34A	S		Surdez com história familiar de hereditariedade materna	m.1555A>G	RNR1	Hetero	Prezant <i>et al.</i> 1993
MT6	9M	M	CI (39%)	Atraso de desenvolvimento; Microcefalia; má evolução			Homo	
R1	35A	M S	Normal	Epilepsia; surdez; <i>stroke-like</i>	m.3243A>G	TL1	Hetero	Goto <i>et al.</i> 1990
R2	71A	M	Normal	Mialgias; CK elevada; RRFs				
R3	70A	M	Normal	Miopatia mitocondrial				
R4	55A	S		Diabetes; surdez neurosensorial				
R5	35A	M	Normal	Surdez neurosensorial; epilepsia; cataratas; ataxia	m.3243A>T	TL1	Hetero	Shaag <i>et al.</i> 1997
R6	51A	S		Debilidade; baixa estatura; parkinsonismo	m.3275C>A + m.9176T>C	TL1 ATP6	Homo Hetero	Garcia-Lozano <i>et al.</i> 2000 Thyagarajan <i>et al.</i> 2005
M1	43A	S		<i>Stroke-like</i>	m.3275C>A	TL1	Homo	
C1	16A	S		Cardiomiopatia	m.3302A>G	TL1	Hetero	Bindoff <i>et al.</i> 1993
R7	45A	M	CI (22%), CIV (32%)	Défi ce de força proximal; insuficiência cardíaca; numerosas RRFs e fibras COX –	m.8342G>A	TK	Hetero	Tiranti <i>et al.</i> 1999
R8	10M	M	CIV (30%)	Convulsões; encefalopatia; hipotonia; regressão do desenvolvimento; hiperlactacidemia MRI – Sugestiva de Leigh	m.8993T>G	ATP6	Homo	Holt <i>et al.</i> 1990
R9	33A	S		Fatigabilidade; fraqueza proximal dos membros superiores	m.9185T>C	ATP6	Hetero	Moslemi <i>et al.</i> 2005
MT23	5A	M S	CI(36%)	Síndrome de Leigh; hiperlactacidemia	m.10191T>C	ND3	Hetero	Taylor <i>et al.</i> 2001
L1	53A	S		Suspeita de LHON	m.11778G>A	ND4	Homo	Wallace <i>et al.</i> 1988
L2	21A	S						
L3	56A	S						
L4	34A	S						
L5	17A	S						
L6	9A	S						
M2	9A	S		<i>Stroke-like</i>	m.13513G>A	ND5	Hetero	Santorelli <i>et al.</i> 1997
M3	30A	M S	Normal	MELAS				
MT17	90A	M	CI (26%), CII (29%)	Cefaleias; deterioração de linguagem; hemiparésia direita; MRI – alterações da substância branca	m.14484T>C	ND6	Homo	Johns <i>et al.</i> 1992

Homo – Homoplasma; Hetero – Heteroplasma; CK – *Creatine Kinase*; RRFs – *Ragged Red Fibers*; MRI – *Magnetic Resonance Imaging*



A mutação m.3243A>G no *MTTL1* pode causar uma variedade de sintomas que incluem diabetes, surdez, neuropatia periférica, insuficiência cardíaca, baixa estatura, convulsões, esquizofrenia, doença renal, PEO e MELAS. Esta mutação é a alteração em heteroplasmia mais frequentemente detectada no mtDNA. É responsável por cerca de 80% dos casos de MELAS clássica, síndrome que representa a forma mais comum de encefalomiopatia ocorrendo em 14% dos doentes com enfarte antes dos 30 anos. Esta mutação foi detectada em quatro casos representando a mutação em heteroplasmia mais frequentemente identificada neste estudo (Figura 21). A idade dos doentes aquando do seu diagnóstico variou entre os 35 e 71 anos, os doentes R1 e R4 apresentavam alguns dos sintomas observados na MELAS mas foram incluídos no grupo em que foram sequenciados os genes da rotina, já que foi o estudo requisitado. Os doentes R2 e R3 foram indicados como suspeitos de citopatia mitocondrial e a informação clínica disponibilizada era mialgias (com RRFs) e miopatia respectivamente, apesar do estudo bioquímico dos complexos da CRM ter sido normal foi efectuado o estudo molecular de rotina. A taxa de mutação mais elevada foi observada na amostra de músculo do paciente R1 que apresenta o fenótipo mais grave, representando um caso de MELAS (Figura 22).

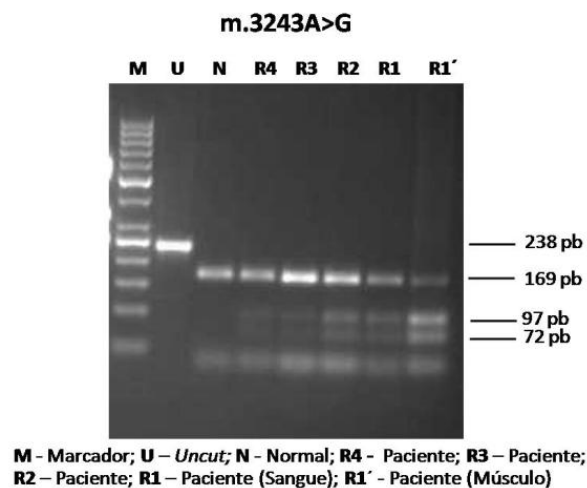


Figura 21 - RFLP para a m.3243A>G.

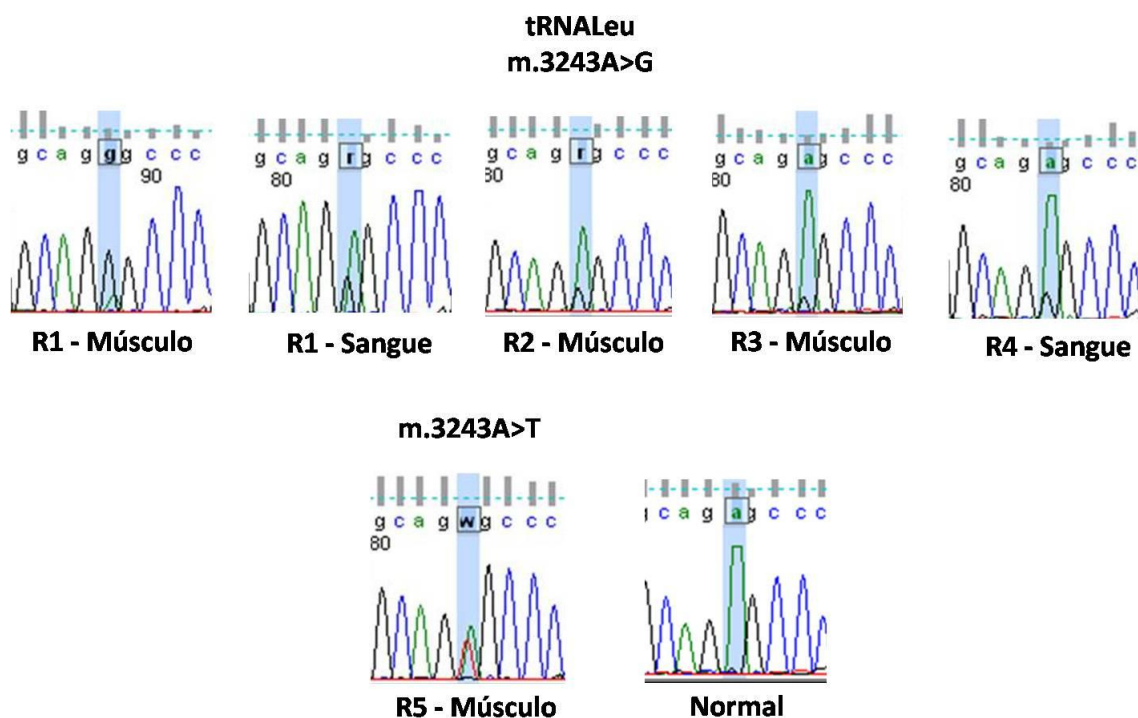


Figura 22 - Sequenciações parciais do *MTTL1* em que estão evidenciadas as mutações m.3243A>G e m.3243A>T bem como o controle normal.

A mutação m.3243A>T no *MTTL1* foi descrita, até a data, em quatro doentes: (i) numa rapariga de 9 anos com encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e um défice múltiplo dos complexos da CRM; (ii) numa rapariga de 7 anos com enfartes cerebrais recorrentes; (iii) numa mulher com surdez neurosensorial e baixa estatura com um défice do complexo I; e (iiii) numa mulher que apresentava CPEO e ptose sem défice dos complexos da CRM. Os estudos funcionais desenvolvidos nestes casos evidenciaram um défice severo da aminoacilação do tRNA^{Leu}, confirmando o carácter patogénico desta alteração (Alston *et al.* 2010). Neste estudo esta mutação foi identificada em heteroplasmia no doente R5 de 35 anos, que apresentava manifestações multissistémicas que incluíam surdez neurosensorial, epilepsia, cataratas e ataxia mas em que não foi detectado um défice enzimático da CRM (Figura 22). Este caso permite alargar o quadro de manifestações associados a esta alteração.

A mutação m.3275C>A no *MTTL1* está referida no MITOMAP como associada a um caso com LHON, a sua patogenicidade no entanto não está confirmada. Nessa descrição a m.3275C>A foi detectada em homoplasmia, e não foi identificada em 50 controlos normais (Garcia-Lozano *et al.* 2000). A m.3275C>A está localizada num *T-loop* que representa uma região variável do tRNA^{Leu}^(UUR) e o nt 3275 apresenta uma baixa conservação. Esta alteração foi detectada neste estudo nos doentes R6 e M1 em homoplasmia em fenótipos diversos da LHON (Figura 23). Estes

factos indicam que será provavelmente um polimorfismo neutro mas o estudo familiar poderá permitir um melhor esclarecimento.

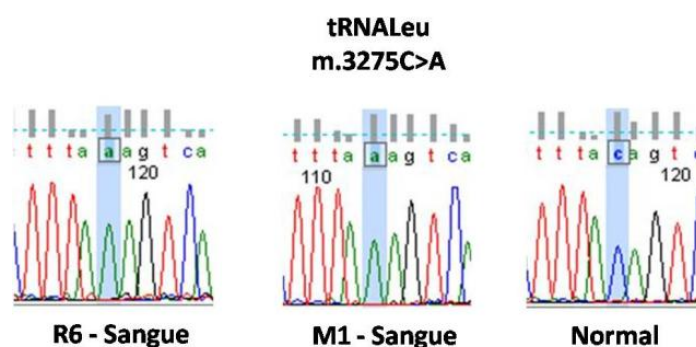


Figura 23 - Sequenciações parciais do *MTTL1* evidenciando a m.3275C>A e o controlo normal.

Adicionalmente, no doente R6 foi igualmente detectada a mutação m.9176T>C com uma elevada heteroplasmia (>90%) (Figura 24). A patogenicidade desta mutação está confirmada e tem sido descrita associada a síndrome de Leigh e Leigh-like, incluindo dois casos invulgares diagnosticados na adolescência e aos 20 anos de idade (Ronchi *et al.* 2011). Neste estudo verificou-se igualmente um atingimento tardio já que o doente tinha 51 anos, e apresentava baixa estatura e parkinsonismo, o que reflecte a heterogeneidade associada às CM e mutações no mtDNA que se vai observando a medida que os doentes vão sendo caracterizados.

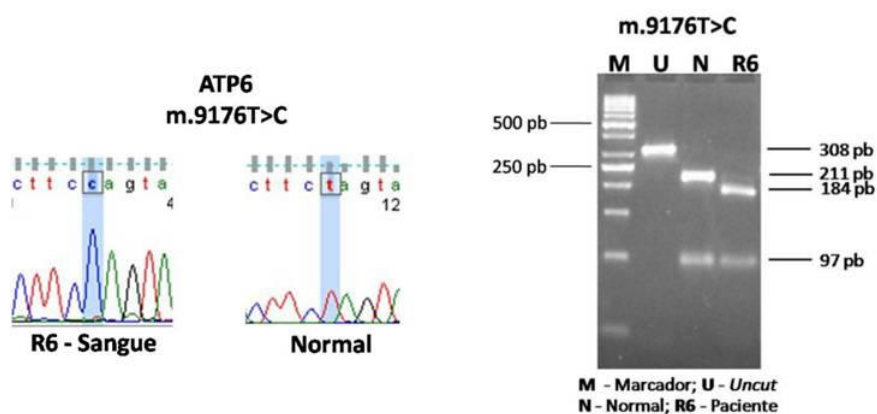


Figura 24 - Sequenciação parcial do *MTATP6* evidenciando a m.9176T>C e o controlo normal; e respectivo RFLP.

A mutação m.3302A>G foi descrita em 12 casos até a data, em que os principais sintomas foram uma miopatia progressiva e intolerância ao exercício. Cinco dos doentes faleceram ainda jovens (10-35 anos) por falência respiratória (Ballhausen *et al.* 2010). Neste estudo esta mutação foi identificada em heteroplasmia num paciente de 16 anos com cardiomiopatia estando em concordância com as descrições anteriores (Figura 25).

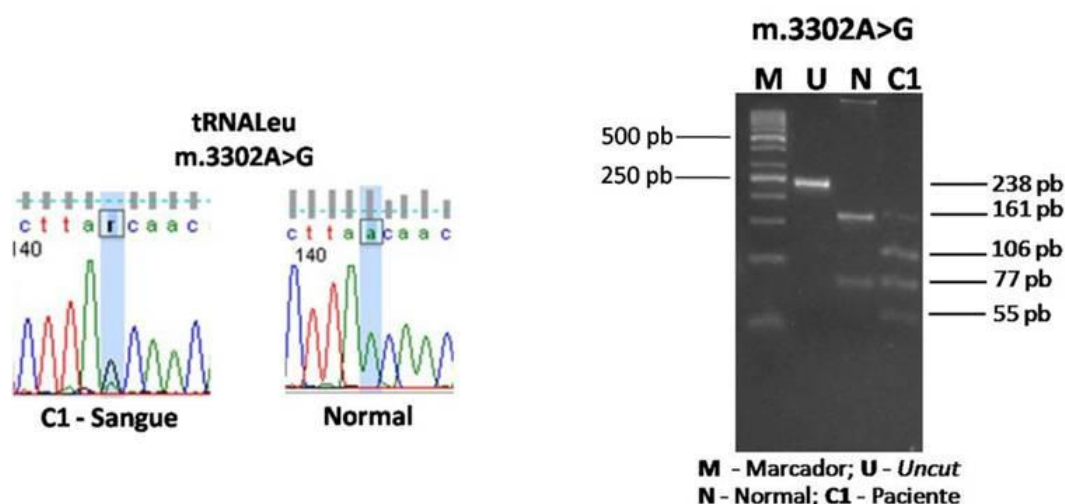


Figura 25 - Sequenciação parcial do *MTTL1* evidenciando a m.3302A>G e o controlo normal; e respectivo RFLP.

A mutação m.8342A>G foi anteriormente descrita numa mulher de 39 anos cujos sintomas iniciais (aos 20 anos) foram fraqueza muscular progressiva, apresentando posteriormente disfagia e dispneia e mais tarde PEO. A biópsia muscular revelou a presença de fibras COX negativas e um défice múltiplo dos complexos da CRM. Apesar de esta alteração apenas ter sido reportada num doente, foram demonstrados vários dos critérios de patogenicidade nessa descrição, estava presente com uma elevada heteroplasmia, a qual foi concordante com o fenótipo bioquímico em fibras isoladas da biópsia muscular, a sua localização no tRNA^{Lys} e disrupção de um par de bases de *Watson-Crick* (Tiranti *et al.* 1999). No presente estudo, esta mutação foi detectada em heteroplasmia num doente de 45 anos com um défice de força proximal e insuficiência cardíaca, um défice múltiplo da CRM, e com RRFs e fibras COX negativas na biópsia muscular; reforçando assim o carácter patogénico desta alteração (Figura 26).

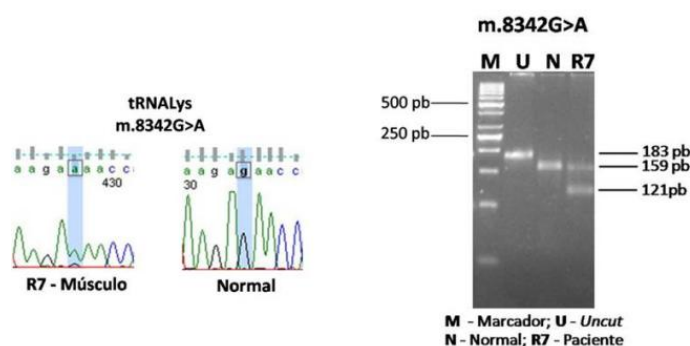


Figura 26 - Sequenciação parcial do *MTTK* evidenciando a m.8342G>A e o controlo normal; e respectivo RFLP.

A mutação m.8993T>G tem sido repetidamente descrita em casos de NARP/LS com taxas mutacionais entre 75-90% e superiores a 90%, respectivamente. Neste estudo foi identificada em elevada heteroplasmia num doente de 10 meses com um défice isolado do complexo IV apresentando o fenótipo de síndrome de Leigh (Figura 27).

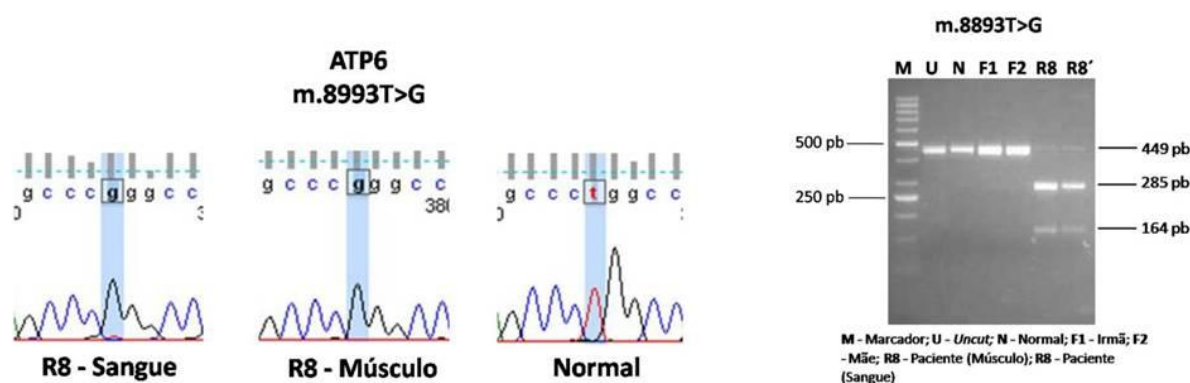


Figura 27 - Sequenciações parciais do *MTATP6* evidenciando a m.8993T>G e o controlo normal; e respectivo RFLP.

A mutação m.9185T>C foi inicialmente descrita associada a LS, com uma taxa mutacional de 97% num doente de 7 anos, a mãe com uma heteroplasmia de 85% era assintomática (Moslemi *et al.* 2005). Castagna e colegas identificaram esta mutação em sete membros de uma família em que se verificou heterogeneidade fenotípica desde uma encefalopatia característica da LS nas crianças até neuropatia periférica e ataxia nos adultos, existia uma correlação entre a heteroplasmia e o grau da doença (Castagna *et al.* 2007). Recentemente foi identificada noutra caso de LS numa criança de 3 anos (Saneto *et al.* 2010). Neste trabalho a m.9185T>C foi detectada praticamente em homoplasmia num doente de 34 anos com fadigabilidade e fraqueza proximal dos membros superiores. Este caso reflecte e reforça a heterogeneidade clínica associada a esta alteração. O estudo genético neste doente foi apenas possível na amostra de sangue no entanto seria importante avaliar a taxa de mutação em biópsia muscular já que poderia explicar o fenótipo menos grave apresentado neste caso (Figura 28).

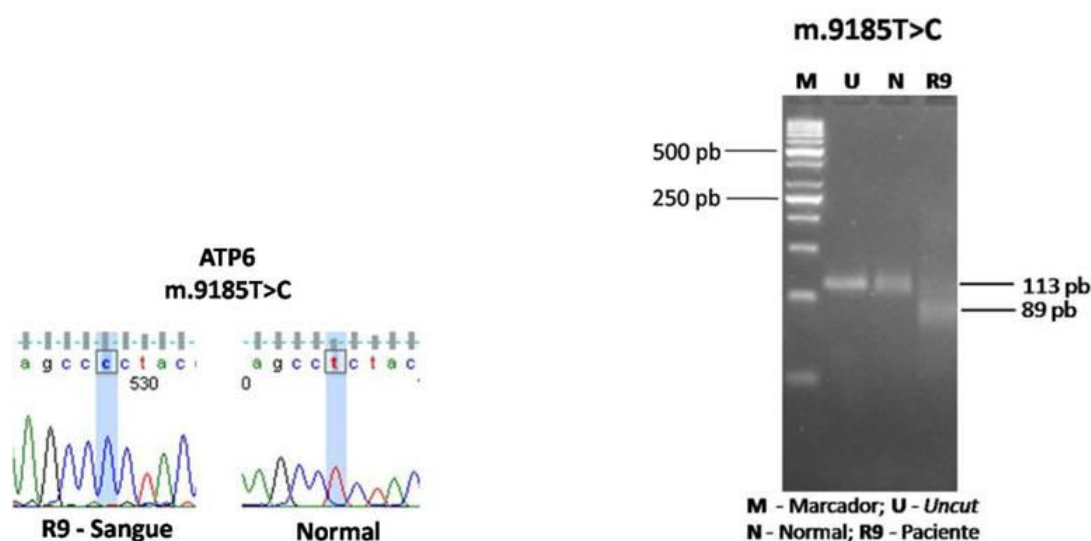


Figura 28 - Sequenciação parcial do *MTATP6* evidenciando a m.9185T>C e o controle normal; e respectivo RFLP.

A m. 10191T>C tem sido reportada associada a LS e LS-like, fenótipo igualmente apresentado pelo doente de 5 anos com um déficit isolado do CI, em que esta alteração foi identificada neste trabalho em heteroplasmia nas amostras de sangue e músculo (Figura 29).

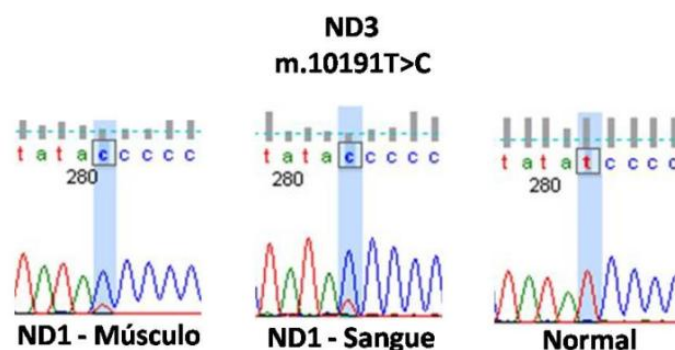


Figura 29 - Sequenciações parciais do *MTND3* evidenciando a m.10191T>C e o controle normal.

A m. 11778G>A é a mutação mais frequentemente associada a LHON, geralmente apresenta-se em homoplasmia, o que se verificou em seis casos suspeitos de LHON neste estudo, com idades compreendidas entre os 9 e 56 anos (Figura 30).

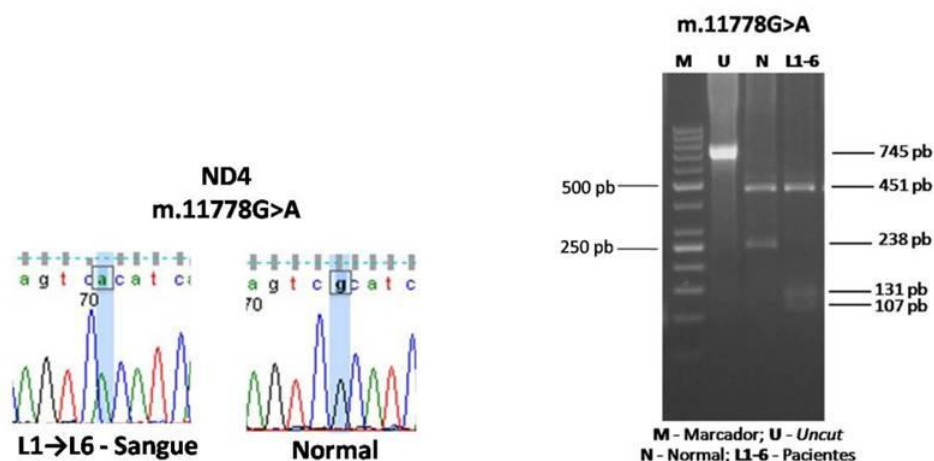


Figura 30 - Sequenciação parcial do *MTND4* evidenciando a m.11778A>G e o controlo normal; e respectivo RFLP.

O *MTND5* foi considerado um *hotspot* para mutações associada a MELAS sendo a m.13513G>A a alteração mais frequente (Shanske *et al.* 2008). Esta mutação foi detectada em heteroplasmia em dois doentes neste estudo, num doente com 9 anos que sofreu um acidente vascular cerebral e o outro de 30 anos que apresentava MELAS (Figura 31).

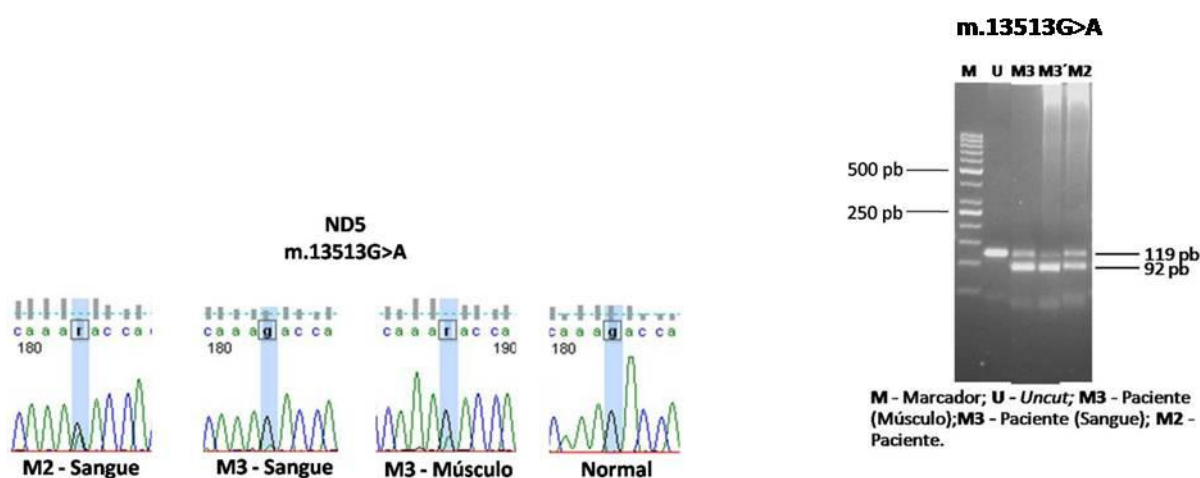


Figura 31 - Sequenciações parciais do *MTND5* evidenciando a m.13513G>A e o controlo normal; e respectivo RFLP.

A m.14484T>C está incluída no grupo de mutações mais frequentes associadas a LHON, a sua penetrância é variável e vários estudos na Europa revelaram que era superior em indivíduos que pertencem ao haplogrupo J, mas a heterogeneidade intrafamiliar observada aponta para outros factores de modificação. Esta alteração apesar de identificada neste estudo, em homoplasmia num doente de 90 anos (haplogrupo H) com atingimento neurológico mas sem sintomas oftalmológicos, não deverá ser responsável por este fenótipo (Figura 32). Existem referências na

literatura de sintomas extra oculares observados em casos com substituições primárias normalmente detectadas na LHON mas não foi totalmente esclarecido se eram responsáveis pelos respectivos fenótipos (Fruhman *et al.* 2011).

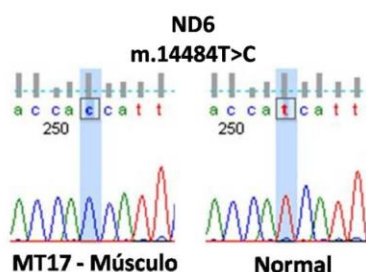


Figura 32 - Sequenciação parcial do MTND6 evidenciando a m.14484T>C e o normal.

Estes resultados permitiram verificar que as mutações patogénicas descritas não deverão ser apenas pesquisadas nos doentes que apresentam fenótipos semelhantes aos anteriormente publicados. A opção de sequenciar os três genes com mais mutações patogénicas descritas, nos doentes com suspeita de CM que não se enquadram nas síndromes clássicas ou sem um fenótipo bem definido, permitiu um diagnóstico molecular em 6 doentes (R2, R3, R5, R6, R7 e R9). Foi assim possível alargar o espectro de manifestações a que estas mutações estão associadas e reforçar o seu carácter de patogenicidade. Confirmou-se igualmente a recorrência de determinadas mutações em associação com às síndromes clássicas.

4.2.2 Mutações com patogenicidade não esclarecida

As mutações com patogenicidade não esclarecida incluem as alterações referidas no MITOMAP como polimorfismos neutros ou mutações associadas a doença (algumas constituem factores de protecção ou predisposição para doenças neurodegenerativas que não CM). Foram detectadas 30 mutações não esclarecidas, todas em homoplasmia (Tabela 7).

Tabela 7 – Mutações pontuais com patogenicidade não esclarecida

Gene	Alteração	Nº casos	Fenótipos	mtDB/ Haplogrupo	Conservação (CI/MCI %)	Previsão
TL1	m.3254C>T	Rotina:1	CPEO	2:2704	7,6/0,1	Pol.
TL1	m.3277G>A	Rotina:4 mtDNA:1	Hipertensão	2:2704		
ND1	m.3308T>C (p.M1T)	Rotina:5 LHON:2 MELAS:1 Cardio:1	MELAS/Surdez	22:2704	82	Pol.
ND1	m.3316G>A (p. A4T)	Rotina:1	NIDDM/LHON/PEO	21:2704	0.05	Pol.
ND1	m.3337G>A (p.V11M)	Rotina:1 Surdez:3	Cardiomiopatia	5:2704	25,6	Pol.

Gene	Alteração (Troca aa)	Nº casos	Fenótipos	mtDB/ Haplogrupo	Conservação (CI/MCI %)	Previsão
ND1	m.3394T>C (p.Y30H)	Rotina:10 LHON:3 MELAS:3 Cardio:2 Surdez:1	LHON/NIDDM/ Défice de CPT	39:2704	92,3	Pol.
ND1	m.3398T>C (p. M31T)	Rotina:3 MELAS:2 Cardio:2	MIDD/cardiomiopatia	5:2704	89,7	N.E
ND1	m.3796A>G (p. T164A)	LHON:1	Distonia nos adultos	10:2704	69,2	N.E
ND1	m. 4216T>C (p.Y304H)	Cardio:3 LHON:9 mtDNA:8	LHON/resistência a insulina	204:2704/ Marcador dos haplogrupos J/T	20,5	Adaptativa
TQ	m.4336T>C	mtDNA:2	AD/PD/surdez	33:2704	42,7/46,1	Adaptativa
TQ	m.4363T>C	Cardio:1	Surdez/ADPM	12:2704	61,3/66,6	N.E
ND2	m.4917A>G (p. N150D)	mtDNA:4	LHON/resistência a insulina	129:2704/ Marcador do haplogrupo T	89,7	Adaptativa
ND2	m.5460G>A (p. A331T)	mtDNA:4	AD/PD	176:2704		
C01	m.6261G>A (p.A120T)	mtDNA:1	LHON/cancro	13:2704	97,4	N.E
TK	m.8348A>G	Rotina:1	Cardiomiopatia	3:2704	46,1/53,5	Pol.
ATP6	m.8668T>C (p.W48R)	Rotina:1	LHON	2:2704	92,3	N.E
ATP6	m.9055G>A (p. A177T)	Rotina:28 mtDNA:1	Factor protector para PD	134:2704		
ATP6	m.T9101T>C (p.I192T)	Rotina:9	LHON	3:2704	15,4	Pol.
ND3	m.10398A>G (p.T114A)	mtDNA:4	Factor protecção PD/longevidade/ cancro da mama	1242::2704/ Marcador do haplogrupo J/T		Adaptativa
ND4	m.11253T>C (p.I165T)	LHON:1	LHON/PD	10:2704	46,1	N.E
TL2	m.12308A>G	LHON:4 MELAS:1 mtDNA:1	CPEO / enfarte / cardiomiopatia/cancro	347:2704/ Marcador do haplogrupo U/K	94,8/99,2	Adaptativa
TS2	m.12236G>A	LHON:2	Surdez	21:2704	48,7/68,1	N.E
ND5	m. 13637A>G (p.Q434R)	MELAS:2	LHON	17:2704	64,1	N.E
ND5	m.13708G>A (p. A458T)	MELAS:9 mtDNA:2	LHON/maior risco de esclerose múltipla	174:2704/ Marcador do haplogrupo J	33,3	Adaptativa
ND6	m.14577T>C (p. I33V)	LHON:1	Diabetes mitocondrial	5:2704	71,7	Pol.
TE	m.14687A>G	LHON:1	Miopatia mitocondrial/ falência respiratória	14:2704	89,7/83,2	N.E
CYB	m.15257G>A (p. D171N)	mtDNA:2	LHON	19:2704/ Marcador do haplogrupo J2	94,8	Adaptativa
CYB	m.15812G>A (p. V356M)	mtDNA:2	LHON	11:2704/VER	25,6	Pol.
TT	m.15924A>G	mtDNA:1	Miopatia mitocondrial infantil fatal	106:2704	74,8/66,6	Pol.
TT	m.15928G>A	mtDNA:4	Esclerose múltipla	106:2704		

As mutações a cinza correspondem a mutações de protecção ou predisposição para doenças neurodegenerativas; mtDB (<http://www.mtddb.igp.uu.se/>) – Base de dados do DNA mitocondrial humano; CI – Índice de conservação; MCI – Índice de conservação entre mamíferos; Pol. – Polimorfismo; N.E – patogenicidade não esclarecida.

Das 30 mutações de carácter não esclarecido dez encontram-se nos tRNAs. A baixa conservação do nucleotídeo 3254 no tRNA^{Leu}_(UUR) e os diversos estudos funcionais sobre o efeito da m.3254T>C neste tRNA sugerem que se trata de um polimorfismo neutro apesar de ter sido associada a CPEO bem como ter sido detectada neste estudo num paciente com suspeita de CM (Levinger *et al.* 2004; Kirino *et al.* 2005 ; Suzuki *et al.* 2011). A alteração m.4336T>C no *MTTQ* foi considerada como um factor de predisposição para a doenças de Alzheimer e doença de Parkinson tendo igualmente sido associada a surdez neurosensorial, trata-se de um polimorfismo antigo e adaptativo que define o subhaplogrupo H5 (Jacobs *et al.* 2005; Howell *et al.* 2005; Wallace, 2007). Esta variação foi encontrada neste estudo em dois doentes com défices isolados da CRM em que se sequenciou o mtDNA completo. A sequenciação não permitiu identificar outras variações relevantes mas pode sugerir-se que a m.4336T>C não será responsável pelos fenótipos apresentados por estes doentes podendo no entanto contribuir para a expressão da doença manifestada. Outra variação no *MTTQ*, a m.4363T>C, num nucleotídeo com um índice de conservação relativamente elevado, localiza-se no *loop* do anticodão podendo assim destabilizar a estrutura do tRNA^{Gln} e consequentemente diminuir o seu metabolismo (Figura 33). Foi identificada neste estudo num doente com cardiomiopatia tendo anteriormente sido reportada em indivíduos com surdez e atraso de desenvolvimento. O estudo funcional desta variação no tRNA^{Gln} permitiria esclarecer o seu efeito e consequentemente a sua patogenicidade. As substituições m.8348G>A e m.15924A>G no *MTTK* e *MTTT* respectivamente, são provavelmente polimorfismos neutros.

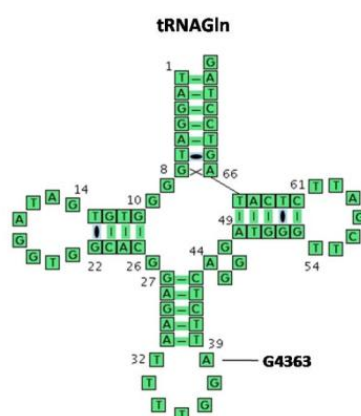


Figura 33 –Representação da m.4363G>A no tRNA^{Gln}.

A m.8348G>A porque foi classificada com um baixo *score* num estudo de Scaglia e colegas em que foi efectuada uma avaliação da patogenicidade das mutações descritas nos tRNAs, e igualmente por ter sido demonstrado que não provocava efeitos na aminoacilação do tRNA^{Lys} (Scaglia *et al.* 2008; Sissler *et al.* 2004); e a m.15924A>G devido a sua elevada frequência na população normal e à avaliação feita na primeira descrição (Brown *et al.* 1992). A variação m.12308A>G representa outro polimorfismo adaptativo que define os haplogrupos U e K (Wallace, 2007). Foi descrita em vários fenótipos, mas apesar de poder contribuir para a sua penetrância não constituirá a causa primária da doença. Neste estudo foi identificada em diversas apresentações num total de 6 doentes. A m.14687A>G no *MTTE* e a m.12236G>A no *MTTS2* detectadas neste estudo em três doentes com LHON, representam substituições de nucleotídeos com uma elevada e média conservação sendo pouco frequentes na população normal. Foram previamente descritas associadas a miopia grave (m.14687A>G) e a surdez neurosensorial (m.12236G>A). Foi sugerido que poderão ter um carácter patogénico com base nos resultados obtidos em diferentes tecidos e através dos respectivos estudos familiares, que indicaram segregação com a doença (Bruno *et al.* 2003; Lévêque *et al.* 2007). A m.14687A>G foi também referenciada num *cluster* do subhaplogrupo T2 e de facto o doente em que foi identificada neste estudo possui igualmente a substituição m.4216T>C considerada um marcador do haplogrupo T (Herrnstadt *et al.* 2002). As mutações associadas com LHON descritas na MITOMAP estão localizadas exclusivamente nos genes estruturais (essencialmente do complexo I) no entanto estas duas alterações encontram-se em genes que codificam tRNAs. Estes factos sugerem que estas variações não deverão causar a neuropatia óptica nestes doentes, no entanto deverão ser desenvolvidos estudos adicionais.

Nos genes estruturais foram identificadas 20 das mutações de patogenicidade não esclarecida. Algumas destas alterações foram consideradas adaptativas sendo específicas de determinados haplogrupos: a m.4216T>C (haplogrupos J/T); a m.4917A>G (haplogrupo T); a m.13708G>A (haplogrupo J) e a m.15257G>A (subhaplogrupo J2). Estas quatro variações foram anteriormente descritas em associação com a LHON e por vezes igualmente na resistência a insulina. Neste estudo não foram na sua maioria identificadas nestes fenótipos.

As alterações em aminoácidos com uma conservação média a elevada, m.6261G>A, m.8668T>C, m.11253T>C e m.13637A>G foram igualmente reportadas em doentes com LHON; neste trabalho cada uma destas variações foi identificada apenas num caso, e só o doente com a m.11253T>C apresentava LHON. As análises bioinformáticas dos efeitos da m.6261G>A e da m.8668T>C nas respectivas proteínas indicam que serão provavelmente patogénicas no entanto foram

igualmente caracterizadas em subhaplogrupos (Abu-Amero *et al.* 2006; Kumar *et al.* 2010; Bandelt *et al.* 2006; Achilli *et al.* 2004). As substituições m.11253T>C e m.13637A>G em aminoácidos com média conservação estão referidas na MITOMAP como possíveis mutações patogénicas primárias associadas a LHON. Estudos adicionais, nomeadamente nos doentes em que foram identificadas neste trabalho, deverão ser efectuados incluindo a determinação dos haplogrupos a que pertencem. Adicionalmente as alterações m.9101T>C e m.15812G>A em aminoácidos de baixa conservação foram também descritas associadas a LHON. A primeira foi alvo de estudos funcionais mas a sua patogenicidade não está totalmente esclarecida e a segunda foi considerada como uma mutação secundária da LHON no MITOMAP (Kucharczyk *et al.* 2009). A elevada frequência observada neste estudo para a m.9101T>C em doentes com suspeita de citopatia mitocondrial mas não com a síndrome LHON, sugere que esta variação não será responsável pela doença apresentada nestes casos. Num estudo, desenvolvido por dois grupos, em que foram utilizados critérios de patogenicidade geralmente aceites: as variações m.3308T>C, m.3316G>A e m.3394T>C foram classificadas como polimorfismos neutros, e a m.3796A>G como possivelmente patogénica (Mitchell *et al.* 2006; Wong, 2007). Esta variação foi anteriormente descrita num adulto com distonia tendo sido identificada no presente estudo num caso com LHON, o esclarecimento sobre a sua patogenicidade necessitará de mais investigação (Simon *et al.* 2003). A baixa conservação e a troca aminoacídica que caracterizam a m.3337G>A, previamente descrita associada a cardiomiopatia, sugerem a classificação desta variação como um polimorfismo neutro (Zifa *et al.* 2008). Duas outras alterações mas estas em aminoácidos com elevada conservação, a m.3398T>C e a m.14577T>C, anteriormente associadas a cardiomiopatia, e/ou diabetes, foram detectadas neste trabalho em doentes com sintomas que levaram a suspeita de citopatia mitocondrial, bem como em doentes com SNHL e LHON (Chen *et al.* 2000; Crispim *et al.* 2008). Estas variações são pouco frequentes na população normal mas a substituição aminoacídica causada pela m.14577T>C não implica modificações físico-químicas tratando-se provavelmente de um polimorfismo neutro. Os efeitos da m.3398T>C terão de ser avaliados através de estudos adicionais. A mutação m.3277G>A foi considerada um factor de predisposição para a hipertensão, as substituições m.5460G>A e m.15928G>A para doenças neurodegenerativas (AD e PD; e esclerose múltipla), e a m.9055G>A e m.10398A>G como factores protectores para a PD bem como contribuindo para a longevidade. Entre estas substituições aquela que mais frequentemente foi detectada nos doentes estudados assim como na população normal foi a m.9055G>A.

Concluindo, a avaliação das 30 mutações incluídas no grupo com patogenicidade não esclarecida (com base na informação disponibilizada na MITOMAP) permitiu através de uma revisão bibliográfica bem como das suas características prever que: dez serão polimorfismos neutros; seis são adaptativas ou seja poderão contribuir para a penetrância das doenças apresentadas mas não constituem a sua causa primária; nove necessitarão de estudos adicionais para esclarecer a respectiva patogenicidade; e cinco constituem factores de predisposição ou protecção para outras doenças (ver Tabela 7).

De notar que a base de dados MITOMAP é um recurso útil para a interpretação dos resultados obtidos nos estudos moleculares que são desenvolvidos para estas doenças, no entanto realça-se que deverão ser feitas pesquisas e investigações adicionais a fim de melhor caracterizar os casos em estudo.

4.2.3 Mutações pontuais não descritas

As mutações não descritas referem-se as variações não reportadas no MITOMAP. Foram identificadas 26 mutações que se enquadram neste grupo: 3 no gene do 16S rRNA; 3 em genes dos tRNAs e 20 nos genes estruturais (todas *missense*) (Tabela 8).

Tabela 8 – Mutações pontuais não descritas

Paciente	Idade	M/S	CRM	Clínica	Mutação (Troca aa)	Gene	mtDB	Taxa de FPR no PolyPhen2 (HumDiv)/SIFT	Conservação (CI/MCI %)	Homo/Hetero	Previsão
MT3	2A	M	CI (21%); CIV (36%)	ADPM; hiperlactacidemia	1992C>T 7501T>C	RNR2 TS1	nd 1:2704	NA	35,8 30,8/36,5	Homo	N.E N.E
MT22	4M	M	CI (37%); CIV (18%)	Disfunção hepática; hiperlactacidemia	2251A>G	RNR2	n.d	NA	48,7	Homo	N.E
R10	2A	M	CIV (33%)	Atraso global; hipotonia axial	3200T>A	RNR2	7:2704	NA	15,3	Homo	Pol.
R11	5M	M	Normal	Diabetes neonatal; intestino curto; hipotonia grave e AVC.	3275C>T	TL1	1:2704	NA	45,9/32,4	Homo	Pol.
R12	13A	M	Normal	ADPM	3355A>G (p.M17V)	ND1	n.d	>10%/1.00	43,6	Homo	Pol.
M4	1A	S		Distonia; hipoglicemia; RMN – Lesões dos gânglios da base	3385A>T (p.I27F)	ND1	n.d	<10%/0.00	46,1	Homo	Pol.
C2	5A	S		Cardiomiopatia dilatada	3451T>C (p.F49L)	ND1	n.d	<10%/0.06	48,7	Hetero	N.E
R13	46A	M	Normal	Enxaqueca; doença da substância branca	3472T>C (p.F56L)	ND1	1:2704	<10%/0.02	94,9	Homo	Pol.
MT16	59A	M	CI (35%)	Ptose bilateral; calcificações dos gânglios da base	4172T>A (p.L289Q)	ND1	4:2704	<5%/0.00	92,3	Homo	Possivelmente patogénica
MT10	60A	M	CII (17%); CIV (37%); CII-III (0.9)	Diabetes; diplopia; ataxia da marcha; disartria; RMN-NARP-like	5817C>T	TC	1:2704	NA	100/98,6	Homo	Provavelmente patogénica
R14	1A	M	Normal	Epilepsia; regressão de desenvolvimento	8417C>T (p.L18I)	ATP8	1:2704	>10%/0.53	66,7	Homo	Pol.
R15	6M	M	Normal	Ventilação assistida; epilepsia; tetraparésia;	8433T>C (p.I23T)	ATP8	2:2704	>10%/0.06	38,4	Homo	Pol.
R16	56A	S		Diabetes; Surdez							
R17	15A	M	Normal	CM	8642A>G (p.N39S)	ATP6	1:2704	>10%/0.17	74,3	Homo	Pol.

Paciente	Idade	M/S	CRM	Clínica	Mutação (Troca aa)	Gene	mtDB	Taxa de FPR no PolyPhen2 (HumDiv)/SIFT	Conservação (CI/MCI %)	Homo/ Hetero	Previsão
R18	44A	M	Normal	CM	8713A>G (p.T63A)	ATP6	1:2704	>10%/ 0.56	23,1	Homo	Pol.
R19	43A	M	CII+III – 1,8	Miopatia	8873G>A (p.G116D)	ATP6	n.d	<10%/ 0.00	97,4	Homo	Possivelmente patogénica
R20	10M	M	CII (12%); CIV (24%)	Disfunção hepática; hiperlactacidemia	8888T>C (p.I121T)	ATP6	1:2704	>10%/ 0.22	0,03	Homo	Pol.
R21	50A	M	Normal	CM	8929A>G (p.T135A)	ATP6	1:2704	>10%/ 0.16	51,3	Hetero	N.E
R22	3M	M	Normal	Hipotonia axial; epilepsia; Hipersinal em T2 no tálamo e putamen	8944A>G (p.M140V)	ATP6	1:2704	>10%/ 1.00	84,6	Homo	Pol.
R23	59A	M	Normal	RRFs	8945T>C (p.M140T)	ATP6	n.d	>10%/ 0.06	84,6	Homo	Possivelmente patogénica
R24	19A	M	Normal	Ptose palpebral	8965A>C (p.I147L)	ATP6	n.d	>10%/ 0.02	94,8	Homo	Pol.
R24	33A	M	Normal	PEO	9095T>C (p.L190P)	ATP6	3:2704	>10%/ 0.05	46,1	Homo	Pol.
R26	3A	S		Epilepsia; atrofia óptica; ataxia	9325T>C (p.M40T)	CO3	2:2704	>10%/ 1.00	23,1	Hetero	N.E
L7	26A	S		Neuropatia óptica	10892A>T (p.I45F)	ND4	n.d	<10%/ 0.63	10,3	Homo	Pol.
L8	34A	S		Neuropatia óptica	10899A>G (p.N47S)	ND4	6:2704	>10%/ 0.06	25,6	Homo	Pol.
MT21	1A	M	CII (37%); CIV (39%)	Epilepsia mioclónica; regressão							
M5	14A	S		Coreoatetose Alt. RMN: MELAS?	13289G>C (p.G318A)	ND5	n.d	<5%/ 0.00	97,4	Hetero	Provavelmente patogénica

PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); SIFT (<http://sift.jcvi.org/>); Homo – homoplasmia; Hetero – Heteroplasmia; Pol. – polimorfismo neutro; N.E – patogenicidade não esclarecida

No *MTRNR2* foram detectadas as mutações m.1992C>T e m.2251G>A localizadas no loop 12 e 18 do domínio II do 16S rRNA, respectivamente (Figura 34). O facto destas alterações se situarem em *loops* bem como a baixa conservação dos nucleotídeos 1992 e 2251, levam a crer que deverão ser polimorfismos neutros.

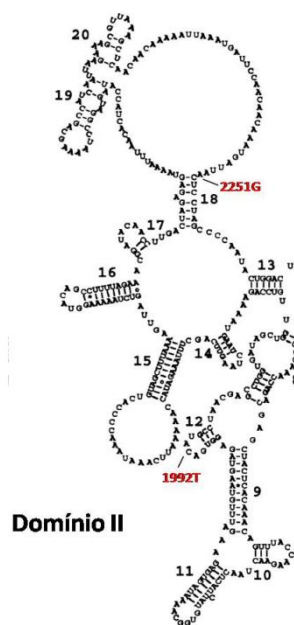


Figura 34 - Estrutura secundária do 16S rRNA em que estão indicadas as mutações m.1992T>C e m.2251G>A.

Deve realçar-se no entanto que no doente MT3 para além da m.1992T>C foi igualmente identificada a m.7501T>C localizada no *D-loop* do tRNASer, apesar de estas duas mutações poderem não afectar significativamente a estrutura dos respectivos RNAs poderão actuar em sinergia e ser responsáveis pelo défice enzimático e fenótipo apresentado neste caso. No doente MT22 com um défice múltiplo para além da m.2251G>A, alteração não reportada na mtDB, também foram identificadas várias mutações adaptativas que em conjunto poderão contribuir para a apresentação deste doente. Assim as mutações m.1992T>C e m.2251G>A, individualmente, serão consideradas com patogenicidade não esclarecida. No *MTRNR2* foi igualmente detectada a mutação m.3200T>A, esta alteração apesar de não referenciada na MITOMAP já foi descrita e o estudo funcional do seu efeito no 16S rRNA mostrou que não alterava a estrutura secundária deste rRNA (Yang *et al.* 2002). Este facto e a baixa conservação do nt 3200 sugerem que esta alteração corresponde a um polimorfismo neutro. Nos tRNAs foram identificadas as mutações m.3275C>T no tRNA^{Leu}(UUR) e m.5817C>T no tRNA^{Cys}. Relembramos que neste estudo, no nucleotídeo 3275 foi igualmente detectada a substituição m.3275C>A tendo sido discutida nas mutações descritas. Foi referido que não existiam dados suficientes para a sua classificação como patogénica e que se trataria provavelmente de um polimorfismo neutro, o mesmo se aplica a

m.3275T>C no entanto seria importante proceder-se ao estudo familiar. A m.5817C>T no tRNACys afecta um nucleotídeo com elevada conservação localizado no *D-stem*. Este nucleotídeo é igualmente relevante por participar nas interações criadas na estrutura terciária deste tRNA (Figura 35 – A e B). Esta mutação será provavelmente responsável pelo défice múltiplo e atingimento multissistémico apresentados pelo doente MT10.

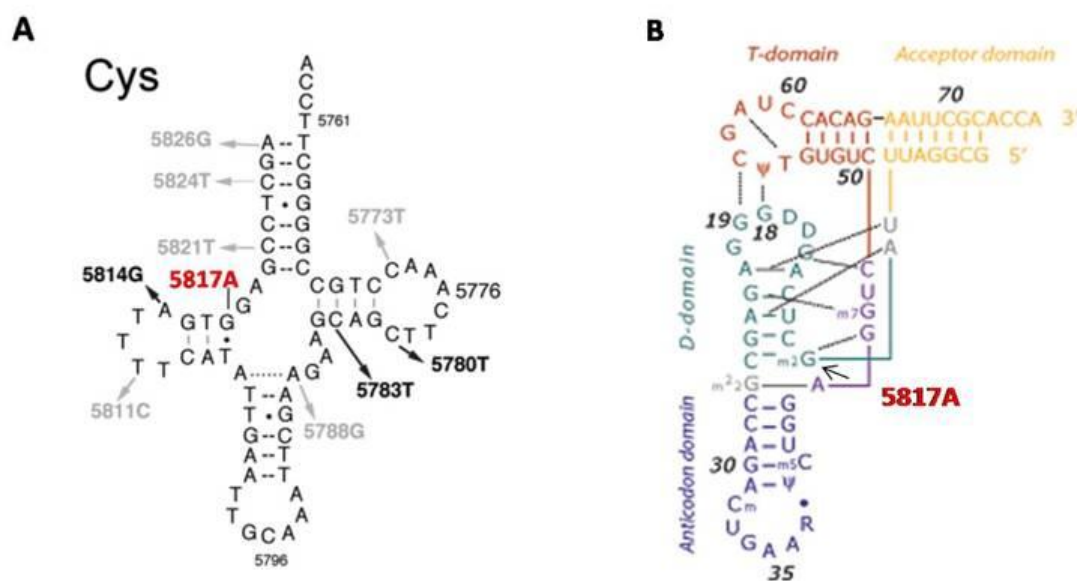


Figura 35 - A - Estrutura secundária do tRNACys em que a preto estão indicadas as mutações patogénicas descritas, e a cinza os polimorfismos; a vermelho está indicada a m.5817C>T; **B** - Estrutura terciária de consenso para os tRNAs mitocondriais em que está indicada a m.5817C>T, bem como as interações envolvidas nesta conformação. Nota: este tRNA é codificado na cadeia pesada.

Das vinte mutações identificadas nos genes estruturais, 9 poderão ser consideradas neutras já que envolvem aminoácidos com uma conservação baixa à média, foram detectadas em homoplasmia, na sua maioria envolvem trocas aminoácídicas dentro do mesmo grupo fisicoquímico ou sem alterações significativas e finalmente porque foram consideradas benignas pela análise bioinformática efectuada no PolyPhen2 e SIFT. Estas mutações são a m.3355A>G (p.M17V), m.8417C>T (p.L18I), m.8433T>C (I123T), m.8642A>G (p.N39S), m.8713A>G (p.T63A), m.8888T>C (p.I121T), m.9095T>C (p.L190P), m.10892A>T (p.I45F) e m.10899A>G (p.N47S). Deverá ressaltar-se que a m.9095T>C e a m.10892A>T foram alvo de previsões de possível patogenicidade através da análise bioinformática mas em apenas um dos programas. Bem como o facto de, a m.8433T>C e m.10899A>G terem sido encontradas em doentes em que já tinham sido detectadas mutações patogénicas descritas a m.3243A>G e m.11778G>A, respectivamente. As substituições m.8944A>G (p.M140V) e m.8965A>C (p.I147L) implicam aminoácidos com uma elevada conservação, mas não causam alterações físico-químicas nos resíduos envolvidos,

estavam presentes em homoplasmia e as previsões bioinformáticas não são consistentemente a favor de efeitos funcionais. Estes dados e os fenótipos apresentados pelos doentes em que foram detectadas permitem sugerir que não constituirão a causa genética destas apresentações, devendo representar polimorfismos raros. A mutação m.8945T>C apresenta as mesmas características à excepção da substituição aminoácídica que envolve a troca de um resíduo apolar por um polar neutro. Apesar de não estar descrita na MITOMAP foi referenciada num estudo que envolveu doentes Japoneses com esquizofrenia (Ueno *et al.* 2009). Nesta investigação foi considerado que poderá afectar a função proteica devido a elevada conservação e ao valor de Grantham obtido para a troca aminoácídica em causa (a tabela de Grantham permite comparar os aminoácidos quanto à polaridade, volume molecular e composição química). Serão necessárias informações adicionais sobre o doente em que a m.8945T>C foi identificada neste trabalho bem como outros estudos para esclarecer o seu efeito na proteína mas será possivelmente patogénica. Ueno e colegas detectaram igualmente a variação m.3472T>C (p.F56L) tendo considerado que devido ao valor Grantham não deverá afectar a proteína. Esta variação no *MTND1* envolve um aminoácido com uma elevada conservação em diferentes espécies, foi detectada em homoplasmia no presente estudo, origina outro resíduo apolar não provocando assim alterações fisicoquímicas mas a submissão no PolyPhen e SIFT revelaram que será possivelmente patogénica. O doente em que foi identificada tinha um estudo bioquímico da CRM normal. Antecipamos que não deverá ser responsável pelo fenótipo apresentado. A variação m.8873G>A (p.G116D) já tinha igualmente sido descrita em heteroplasmia num estudo que envolveu linhas celulares de tumor colorectal, está num resíduo muito conservado, foi detectada no presente trabalho em homoplasmia num doente com miopatia e a actividade combinada dos complexos II e III diminuída. A previsão no PolyPhen e SIFT é de possível patogenicidade e poderá devido as alterações físico-químicas implicadas ter efeitos deletérios na ATPase6, adicionalmente não foi descrita no mtDB. O esclarecimento sobre os efeitos desta alteração necessitará de mais estudos mas será possivelmente patogénica. A m.4172T>A (p.L289Q) no *MTND1* apresenta essencialmente as mesmas características mas origina um aminoácido polar neutro e é rara na população normal. Foi identificada num doente com um défice isolado do complexo I e localizando-se numa subunidade estrutural deste componente da CRM poderá ser responsável pelo fenótipo apresentado no doente MT16, apesar de estar presente em homoplasmia. No entanto deverá aprofundar-se a investigação. A m.3385A>T apesar de considerada como possivelmente patogénica através da análise bioinformática, devido a conservação relativamente baixa do resíduo envolvido, ao facto de originar outro aminoácido apolar e ter sido identificada

em homoplasmia numa criança de um ano com um fenótipo grave, deverá constituir um polimorfismo neutro. E finalmente, quatro alterações foram detectadas em heteroplasmia: a m.3451T>C (p.F49L), m.8929A>G (p.T135A), m.9325T>C (p.M40T) e a m.13289G>C (p.G318A). A m.3451T>C num resíduo apolar com uma conservação média origina uma leucina também apolar, foi prevista como sendo possivelmente patogénica apenas no PolyPhen e foi detectada no sangue de um doente com cardiomiopatia. Será necessário proceder-se ao estudo bioquímico e genético em biópsia muscular bem como ao estudo familiar da linha materna para esclarecer a patogenicidade desta variação (Figura 36).

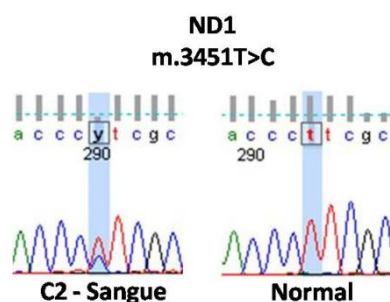


Figura 36 - Sequenciação parcial do *MTND1* evidenciando a m.3451T>C e o controlo normal.

As mutações m.8929A>G (p.T135A) e m.9325T>C (p.M40T) afectam resíduos com uma conservação média e baixa respectivamente, a troca aminoacídica leva a substituição de aminoácidos apolares por polares neutros, e a análise bioinformática classificou ambas as variações como sendo benignas (Figura 37). A m.8929A>G foi detectada num doente com o estudo bioquímico da CRM normal mas a alteração está no MTATP6 e este estudo não inclui a determinação da ATPase6. A m.9325T>C foi identificada numa criança de 3 anos com uma apresentação multissistémica em que não foi disponibilizada biópsia muscular.

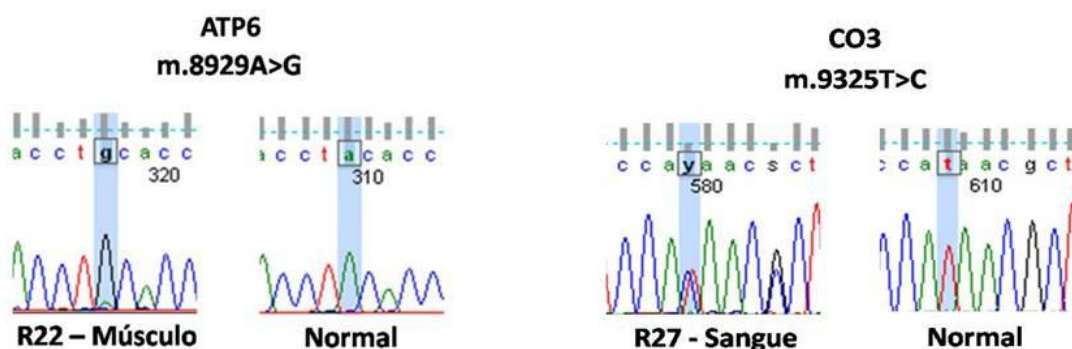


Figura 37 - Sequenciações parciais do *MTATP6* e *MTCO3* evidenciando as mutações m.8929A>G e m.9325T>C bem como os respectivos controlos normais.

Estudos complementares deverão ser considerados uma vez que estas alterações foram detectadas em heteroplasmia, realçando que a taxa mutacional na biópsia do doente com a m.8929A>G era muito elevada. No doente com a m.9325T>C foi igualmente identificada em heteroplasmia a alteração m.9329G>C que corresponde a uma substituição sinónima não descrita. Finalmente a m.13289G>C leva a substituição de uma glicina com uma conservação próxima dos 100% por outro aminoácido apolar, foi considerada como provavelmente patogénica quando submetida nos programas PolyPhen e SIFT, e não foi até a data reportada na mtDB (Figura 38). Não foi possível efectuar o estudo enzimático da CRM no doente em que foi identificada já que só foi disponibilizado sangue. Este doente apresentava uma MRI compatível com a MELAS, e como já foi referido o *MTND5* em que esta alteração se encontra foi considerado um *hotspot* para mutações patogénicas associadas a esta síndrome. Seria importante efectuar o estudo bioquímico da CRM bem como o estudo genético em biópsia muscular, e o estudo familiar da linha materna mas esta alteração poderá provavelmente constituir a causa genética neste caso.

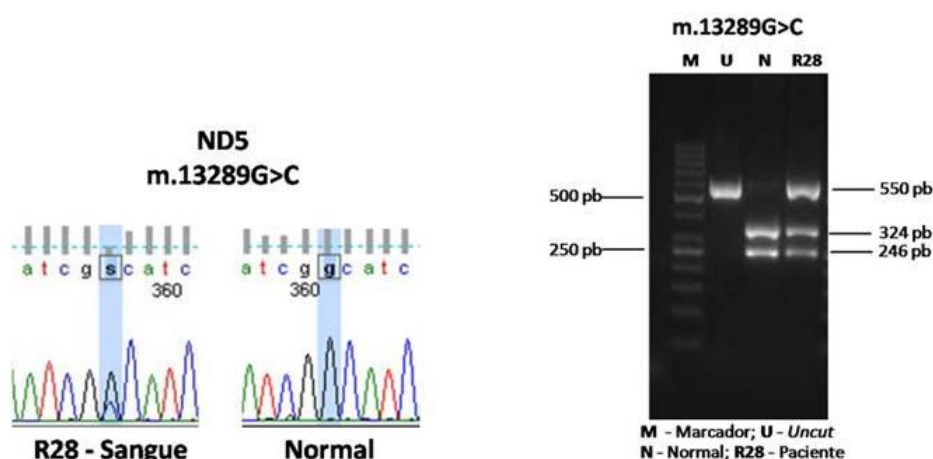


Figura 38 - Sequenciação parcial do *MTND5* evidenciando a m.13289G>C e o controlo normal; e respectivo RFLP.

Concluindo, das 26 mutações não descritas no MITOMAP prevê-se que: 15 serão plomorfismos neutros; seis não possuem critérios suficientes para serem classificadas correspondendo a mutações com patogenicidade não esclarecida; três serão possivelmente patogénicas; e duas provavelmente patogénicas (ver Tabela 8). Verificou-se igualmente que a procura de informação sobre mutações detectadas no mtDNA não deverá limitar-se a base de dados disponível na MITOMAP.

4.2.4 Rearranjos

O *Southern-Blotting* permitiu detectar deleções simples em três doentes (S1, S4 e S32) que apresentavam sintomas normalmente associados a rearranjos no mtDNA (Figura 39).

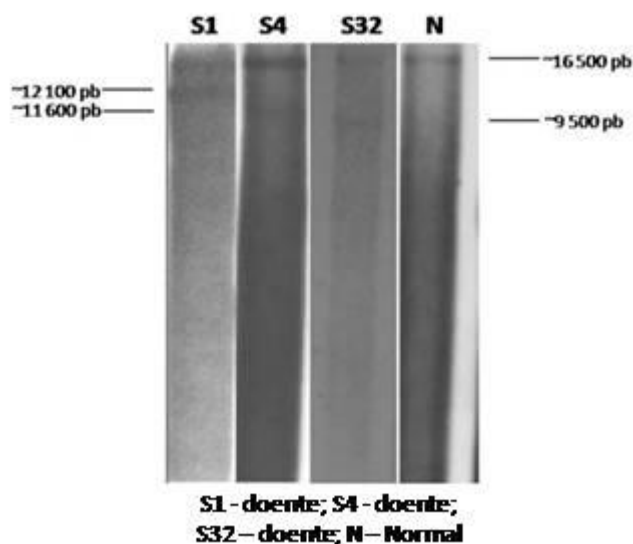


Figura 39 - *Southern-blotting* evidenciando as bandas correspondentes a moléculas de mtDNA deletadas.

Foi possível confirmar a presença das deleções por PCR, e fazer uma avaliação aproximada do tamanho do rearranjo. O doente S1 tem uma deleção de cerca de 4400 pb, o S3 de aproximadamente 4900 pb (provavelmente a deleção comum) e o S32 apresenta a deleção de maior tamanho com cerca de 7 000 pb (Figura 40).

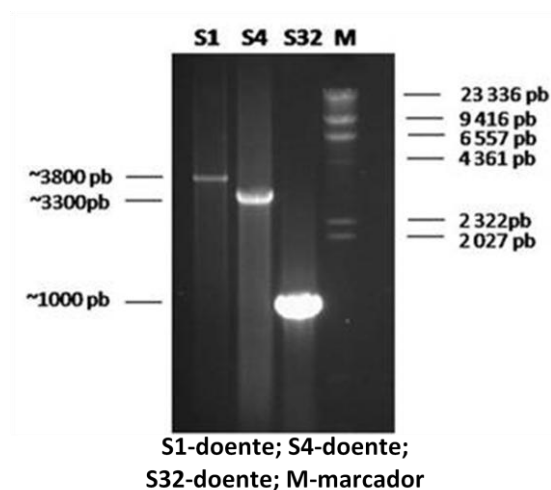


Figura 40 - Fotografia da amplificação do fragmento compreendido entre o nt 7433 e nt 15600 do mtDNA que corresponde a um tamanho de aproximadamente 8 000 pb: bandas obtidas para os três pacientes.

Não foram identificadas deleções múltiplas em nenhum dos pacientes o que não exclui a sua presença já que devido a baixa heteroplasmia geralmente associada a estas alterações e eventualmente a falta de sensibilidade do tipo de marcação utilizada é possível que apesar de presentes não tenham sido detectadas. A pesquisa de deleções múltiplas pode também ser feita por PCR longo com vários pares de *primers*, o que deverá ser considerado nos doentes em que existe ainda uma forte suspeita.

4.2.5 Avaliação da sequenciação do mtDNA completo.

A sequenciação completa do mtDNA foi efectuada em 23 doentes com forte suspeita de CM e/ou um défice bioquímico da CRM. A tabela apresentada a seguir mostra os resultados obtidos para cada um destes casos, de notar que são apenas referidas as mutações patogénicas descritas, mutações não descritas ou com patogenicidade não esclarecida (Tabela 9). Foram no entanto igualmente identificados numerosos polimorfismos já descritos bem como novas alterações sinónimas, estes permitiram caracterizar o haplogrupo a que pertencem os doentes estudados. Este estudo genético permitiu detectar 3 mutações patogénicas descritas: a m.1555A>G no *MTRNR1*, a m.14484T>C no *MTND4* e a m.10191T>C no *MTND5*. As duas primeiras constituem um achado peculiar já que foram até à data apenas descritas na surdez neurosensorial não sindrómica e na LHON ou LHON-like, respectivamente. Estes fenótipos não correspondem aos que foram apresentados pelos doentes do presente estudo (MT6 e MT17). Adicionalmente representam mutações com uma penetrância variável que está dependente de vários factores como os ambientais, *background* genético e outros modificadores eventualmente nucleares. Será relevante proceder-se aos respectivos estudos familiares e investigações adicionais mas com os conhecimentos actuais antecipa-se que não serão responsáveis pelos fenótipos apresentados nestes casos. Também foi possível identificar quatro mutações não descritas relevantes, duas foram detectadas num único doente (MT3) e poderão em conjunto ter um efeito deletério e as outras duas foram consideradas possivelmente patogénicas. Adicionalmente duas outras mutações não tinham sido descritas, a m.10899A>G no *MTND4* classificada como um polimorfismo neutro e a m.2251A>G no *MTRNR2*. Esta última como já foi referido poderá actuar em sinergia com várias mutações adaptativas e assim ser responsável pelo fenótipo apresentado pelo doente MT22. Assim a causa genética foi identificada no paciente MT23 (m.10191T>C) e provavelmente em quatro outros casos: o MT3 (m.1992C>T e m.7501T>C), o MT10 (m.5817C>T), o MT16 (m.4172T>A) e o MT22 (m.2251A>G) correspondendo a uma percentagem de 22%.

Tabela 9 – Mutações detectadas através da sequenciação do mtDNA completo.

Paciente	Genes dos rRNAs, tRNAs e estruturais																Haplo grupo
	RNR1	RNR2	TL1	ND1	TQ	ND2	TC	CO1	TS1	ATP6	ND3	ND4	ND5	ND6	CYB	TT	
MT1				T4216C						G9055A							H1
MT2											A10398G					A15924G	I
MT3		C1992T		T4216C		A4917G			T7501C							G15928A	T2
MT4					T4336C												H5
MT5				T4216C							A10398G						J1c
MT6	A1555G																H1
MT7				T4216C		A4917G										G15928A	T2
MT8						G5460A											H1
MT9						G5460A											H1
MT10				T4216C		A4917G	C5817T	G6261A								G15928A	T2
MT11																	H
MT12					T4336C												H5
MT13																	H1
MT14																	H1
MT15																	H1
MT16				T4172A									A12308G				U
MT17														T14484C			H
MT18				T4216C							A10398G		G13708A		G15257A G15812A		H
MT19			G3277A	T4216C		A4917G										G15928A	T2
MT20																	H
MT21												A10899G					H
MT22		A2251G		T4216C							A10398G		G13708A		G15257A G15812A		H
MT23														T10191C			

Mutações: **adaptativas**; **factores de predisposição**; **não descritas**; **patogénicas descritas**.

Para além de possibilitar um maior número de diagnósticos moleculares a sequenciação do mtDNA completo permite igualmente redefinir o espectro de fenótipos a que determinadas mutações consideradas patogénicas poderão estar associadas, bem como identificar mutações adaptativas que apesar de não constituírem a causa primária da doença contribuirão para a sua penetrância. Adicionalmente possibilita a caracterização dos haplogrupos, informação que pode ser relevante para a interpretação dos resultados obtidos.

4.2.6 Avaliação geral dos resultados.

A avaliação geral inclui a análise dos resultados em cada um dos grupos estudados e assim: em 546 doentes em que foi efectuado o estudo molecular de rotina bem como em alguns casos a pesquisa de deleções e sequenciação do mtDNA completo prevê-se que tenha sido possível identificar a causa genética em 19 doentes (R1→R9, R19, R23; MT3, MT10, MT16, MT22, MT23; S1, S4 e S32) correspondendo a 3,5%; nos 95 doentes com LHON em 6 (L1→L6) correspondendo a 6,3%; em 112 casos com MELAS em 3 (M2, M3 e M5) correspondendo a 2,7%; em 38 doentes com cardiomiopatia num caso (C1) correspondendo a 2,6%; e em 31 doentes com surdez igualmente num caso (SN1) correspondendo a 3,2%. As frequências obtidas para os grupos com síndromes clássicas ou fenótipos bem definidos poderão ter sido condicionadas pelo facto de os doentes que são incluídos nos grupos com síndromes nem sempre apresentarem todos os sintomas que as caracterizam, e relativamente a surdez e a cardiomiopatia por constituírem sintomas que podem ser causados por numerosas mutações em genes não mitocondriais.

Adicionalmente foram identificadas 12 mutações (m.3398T>C, m.3796A>G, m.4363T>C, m.6261G>A, m.8668T>C, m.11253T>C, m.12236G>A, m.13637A>G, m.14687A>G, m.3451T>C, m.8929A>G e m.9325T>C) em 19 doentes dispersos nos diferentes grupos, em que se considerou que a patogenicidade não estava esclarecida mas que com estudos adicionais poderão permitir o diagnóstico molecular (foram excluídas as três que já estão incluídas na avaliação anterior para os casos MT3 e MT22). No total dos 822 doentes prevê-se então que se tenha identificado a causa genética em 3,6% dos casos, no entanto incluindo as alterações com patogenicidade não esclarecida (muitas vezes consideradas noutros estudos) a frequência corresponderá a 5,7% dos doentes. A percentagem de doentes com CM com mutações no mtDNA identificadas varia noutros estudos entre os 5 e 25%, realçando que os valores mais elevados correspondem a estudos em que foi sequenciado o mtDNA completo o que também foi observado no presente estudo (Valente *et al.* 2009; Wani *et al.* 2007; Choi *et al.* 2010). Os restantes indivíduos possuirão uma mutação no genoma mitocondrial não investigado ou num dos muitos genes nucleares conhecidos (ou por identificar) em que estão descritas mutações patogénicas associadas a estas

patologias (ANEXO I). O algoritmo aqui disponibilizado auxiliará na busca e identificação de algumas destas mutações.

5 Conclusão e perspectivas futuras.

A abordagem apresentada permitiu identificar a causa genética no DNA mitocondrial num número significativo de doentes com suspeita de CM, considerando o facto de na maioria dos casos o genoma mitocondrial ter apenas sido parcialmente avaliado. Possibilitou igualmente verificar que a percentagem de casos em que a investigação é positiva poderá aumentar consideravelmente se se sequenciar o mtDNA completo, o que só foi possível num número reduzido de doentes. Na sequência deste trabalho as mutações com patogenicidade não esclarecida deverão ser alvo de estudos complementares, e deverá igualmente proceder-se a sequenciação do mtDNA completo nos muitos doentes em que ainda não foi disponibilizada, bem como a pesquisa de possíveis rearranjos nos casos em que não foi parcial ou totalmente excluída.

O algoritmo inclui adicionalmente uma orientação para o estudo molecular dos genes nucleares implicados nas CM, mas será agora necessário seleccionar os doentes a estudar em função da informação disponível e assim avaliar a eficácia destas guias de orientação. Muitos dos genes nucleares conhecidos ficarão no entanto por investigar, havendo igualmente um número ainda considerável de genes por identificar. Esta abordagem reflecte a avaliação possível tendo em conta os recursos e conhecimentos disponíveis, mas deverá ser adaptada à medida que forem disponibilizados meios e que a informação for evoluindo. No futuro espera-se que as novas técnicas de biologia molecular aumentem consideravelmente a probabilidade de um diagnóstico molecular, mas não sabemos quando poderemos aceder a este tipo de tecnologia. Apesar do número de casos em que este algoritmo permitirá um diagnóstico molecular parecer ainda relativamente pequeno, esta informação será relevante para as muitas famílias que são afectadas por estas doenças que podem ser devastadoras. Espera-se igualmente que esta abordagem possa de facto auxiliar os clínicos na selecção dos doentes bem como na orientação a seguir. Sendo também importante que a informação disponibilizada bem como os estudos que antecederem a investigação molecular sejam cada vez mais assertivos já que permitirá uma melhor rentibilização dos meios assim como uma maior eficácia no diagnóstico molecular.

BIBLIOGRAFIA

6 Bibliografia

- Abu-Amero KK, Bosley TM. 2006. Mitochondrial abnormalities in patients with LHON-like optic neuropathies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 4211-20.
- Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R *et al.* 2004. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 75: 910-18.
- Acín-Pérez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C *et al.* 2004. Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. *Mol. Cell.* 13 : 805-15.
- Alston CL, Bender A, Hargreaves IP, Mundy H, Deshpande C, Klopstock T *et al.* 2010. The pathogenic m.3243A>T mitochondrial DNA mutation is associated with a variable neurological phenotype. *Neuromuscul. Disord.* 20: 403-06.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J *et al.* 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290: 457-65.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23: 147.
- Ballhausen D, Guerry F, Hahn D, Schaller A, Nuoffer JM, Bonafé L *et al.* 2010. Mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation m.3302A > G presenting as childhood-onset severe myopathy: threshold determination through segregation study. *J. Inherit. Metab. Dis.* doi: 10.1007/s10545-010-9098-2.
- Bandelt HJ, Salas A, Bravi CM. 2006. What is a 'novel' mtDNA mutation--and does 'novelty' really matter? *J. Hum. Genet.* 51: 1073-82.
- Bandyopadhyay SK, Dutta A. 2010. Mitochondrial Medicine. *J. Assoc. Physicians India.* 58: 237-41.
- Barel O, Shorer Z, Flusser H, Ofir R, Narkis G, Finer G *et al.* 2008. Mitochondrial Complex III Deficiency Associated with a Homozygous Mutation in UQCRCQ. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 1211-16.
- Bayley JP, Kunst HP, Cascon A, Sampietro ML, Gaal J, Korpershoek E *et al.* 2010. SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma. *Lancet . Oncol.* 11: 366-72.
- Bénit P, Beugnot R, Chretien D, Giurgea I, De Lonlay-Debeney P, Issartel JP *et al.* 2003. Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum. Mutat.* 21: 582-86.
- Bénit P, Lebon S, Rustin P. 2009. Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793: 181-85.
- Berger I, HersHKovitz E, Shaag A, Edvardson S, Saada A, Elpeleg O. 2008. Mitochondrial complex I deficiency caused by a deleterious NDUFA11 mutation. *Ann. Neurol.* 63: 405-08.
- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. 2002. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology.* 59: 1406-11.
- Berrisford JM, Sazanov LA. 2009. Structural Basis for the Mechanism of Respiratory Complex I. *J. Biol. Chem.* 284: 29773-83.
- Bindoff LA, Howell N, Poulton J, McCullough DA, Morten KJ, Lightowlers RN *et al.* 1993. Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA. A potential disease mechanism. *J. Biol. Chem.* 268: 19559-64.
- Blakely EL, Mitchell AL, Fisher N, Meunier B, Nijtmans LG, Schaefer AM *et al.* 2005. A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *FEBS J.* 272: 3583-92.
- Boles RG, Friedlich P. 2010. Should patients be screened for 12S rRNA mutations before treatment with aminoglycosides?. *Mitochondrion.* 10: 391-92.
- Borhani Haghighi A, Nabavizadeh A, Sass JO, Safari A, Lankarani KB. 2009. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Arch. Iran. Med.* 12: 588-90.
- Brown MD, Torroni A, Shoffner JM, Wallace DC. 1992. Mitochondrial tRNA(Thr) mutations and lethal infantile mitochondrial myopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 446-47.
- Brown TA, Ceconi C, Tkachuk AN, Custamante C, Clayton DA. 2005. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, no via a strand coupled mechanism. *Genes Dev.* 19: 2466-76.

- Bruno C, Sacco O, Santorelli FM, Assereto S, Tonoli E, Bado M *et al.* 2003. Mitochondrial myopathy and respiratory failure associated with a new mutation in the mitochondrial transfer ribonucleic acid glutamic acid gene. *J. Child. Neurol.* 18: 300-03.
- Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, Briem E, Lamantea E, Carrara F *et al.* 2004. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1659: 136-47.
- Bugiani M, Tiranti V, Farina L, Uziel G, Zeviani M. 2005. Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J. Med. Genet.* 42:e28
- Burk A, Douzery E, Springer MS. 2002. The Secondary Structure of Mammalian Mitochondrial 16S rRNA Molecules: Refinements Based on a Comparative Phylogenetic Approach. *J. Mamm. Evol.* 9: 225-52.
- Bykhovskaya Y, Mengesha E, Fischel-Ghodsian N. 2009. Phenotypic expression of maternally inherited deafness is affected by RNA modification and cytoplasmic ribosomal proteins. *Mol. Genet. Metab.* 97: 297-304.
- Calvo SE, Tucker EJ, Compton AG, Kirby DM, Crawford G, Burt NP *et al.* 2010. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat. Genet.* 42: 851-58.
- Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K *et al.* 2007. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat. Genet.* 39: 386-90.
- Carelli V, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O *et al.* 2006. Haplogroup Effects and Recombination of Mitochondrial DNA: Novel Clues from the Analysis of Leber Hereditary Optic Neuropathy Pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 78: 564-74.
- Castagna AE, Addis J, McInnes RR, Clarke JT, Ashby P, Blaser S *et al.* 2007. Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A: 808-16.
- Chen J, Yuan H, Lu J, Liu X, Wang G, Zhu Y *et al.* 2008. Mutations at position 7445 in the precursor of mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene in three maternal Chinese pedigrees with sensorineural hearing loss. *Mitochondrion.* 8: 285-92.
- Chen Y, Liao WX, Roy AC, Loganath A, Ng SC. 2000. Mitochondrial gene mutations in gestational diabetes mellitus. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 48: 29-35.
- Chihara N, Amo T, Tokunaga A, Yuzuriha R, Wolf AM, Asoh S *et al.* 2011. Mitochondrial DNA alterations in colorectal cancer cell lines. *J. Nihon. Med. Sch.* 78: 13-21.
- Chinnery PF, Schon EA. 2003. Mitochondria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 74:1188-1199.
- Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C *et al.* 2004. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet.* 364: 592-96.
- Choi BO, Hwang JH, Kim J, Cho EM, Cho SY, Hwang SJ *et al.* 2008. A MELAS syndrome family harboring two mutations in mitochondrial genome. *Exp. Mol. Med.* 40: 354-60.
- Choi BO, Hwang JH, Cho EM, Jeong EH, Hyun YS, Jeon HJ *et al.* 2010. Mutational analysis of whole mitochondrial DNA in patients with MELAS and MERRF diseases. *Exp. Mol. Med.* 42:446-55.
- Clayton DA, Vinograd J. 1967. Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. *Nature.* 216 : 652-57.
- Cohen BH, Naviaux RK. 2010. The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders. *Methods.* 51: 364-73.
- Coenen MJ, van den Heuvel LP, Ugalde C, Ten Brinke M, Nijtmans LG, Trijbels FJ. Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene. *Ann. Neurol.* 56: 560-64.
- Çolak Y, Tuncer İ, Çağlar E, Barutçu D, Ulaşoğlu C, Kızıltaş Ş. 2010. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: case report. *Turk. J. Gastroenterol.* 21: 305-07.
- Crispim D, Estivalet AA, Roisenberg I, Gross JL, Canani LH. 2008. Prevalence of 15 mitochondrial DNA mutations among type 2 diabetic patients with or without clinical characteristics of maternally inherited diabetes and deafness. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52: 1228-35.
- Davies KM, Strauss M, Daum B, Kief JH, Osiewacz HD, Rycovska A *et al.* 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 14121-26.
- De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, De Clercq I, Eyskens F, Gerlo E *et al.* 2004. Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J. Med. Genet.* 41: 120-24.
- Di Donato S. 2009. Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *J Neurol.* 256: 693-710.
- Diaz F. 2010. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802:

- 100-10.
- Diaz F, Kotarsky H, Fellman V, Moraes CT. 2011. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Fetal Neonatal Med.* 16: 197-204.
- DiMauro S, Schon EA. 2008. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 31: 91-123.
- Dimmock DP, Zhang Q, Dionisi-Vici C, Carrozzo R, Shieh J, Tang LY *et al.* 2008. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Hum. Mutat.* 29: 330-31.
- Djafarzadeh R, Kerscher S, Zwicker K, Radermacher M, Lindahl M, Schagger H *et al.* 2000. Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADHdehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459: 230-38.
- Dunning CJ, McKenzie M, Sugiana C, Lazarou M, Silke J, Connelly A *et al.* 2007. Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. *EMBO J.* 26: 3227-37.
- Eichhorn-Mulligan K, Cestari DM. 2008. The Genetics of Leber Hereditary Optic Neuropathy -Prototype of an Inherited Optic Neuropathy with Mitochondrial Dysfunction. *Semin. Ophthalmol.* 23: 27-37.
- El-Hattab AW, Li FY, Schmitt E, Zhang S, Craigen WJ, Wong LJ. 2010. MPV17-associated hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome: new patients and novel mutations. *Mol. Genet. Metab.* 99: 300-08.
- Elpeleg O, Miller C, HersHKovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S *et al.* 2005. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 76: 1081-86.
- Fernandez-Vizarra E, Bugiani M, Goffrini P, Carrara F, Farina L, Procopio E *et al.* 2007. Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum. Mol. Genet.* 16: 1241-52.
- Fernández-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M. 2009. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793: 200-11.
- Ferreira M, Torraco A, Rizza T, Fattori F, Meschini MC, Castana C *et al.* 2011. Progressive cavitating leukoencephalopathy associated with respiratory chain complex I deficiency and a novel mutation in NDUF51. *Neurogenetics.* 12: 9-17.
- Finsterer J. 2008. Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults. *Pediatr. Neurol.* 39: 223-35.
- Finsterer J, Harbo HF, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B *et al.* 2009. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Eur. J. Neurol.* 16: 1255-64.
- Finsterer J. 2010. Treatment of mitochondrial disorder. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 14: 29-44.
- Fontanesi F, Soto IC, Barrientos A. 2008. Cytochrome c Oxidase Biogenesis: New levels of Regulation. *IUBMB Life.* 60: 557-68.
- Fraser JA, Biousse V, Newman NJ. 2010. The Neuro-ophthalmology of Mitochondrial Disease. *Surv. Ophthalmol.* 55: 299-334
- Fratton C, Gorman GS, Stewart JD, Buddles M, Smith C, Evans J. 2010. The clinical, histochemical, and molecular spectrum of PEO1 (Twinkle)-linked adPEO. *Neurology.* 74: 1619-26.
- Fruhman G, Landsverk ML, Lotze TE, Hunter JV, Wangler MF, Adesina AM *et al.* 2011. Atypical presentation of Leigh syndrome associated with a Leber hereditary optic neuropathy primary mitochondrial DNA mutation. *Mol. Genet. Metab.* 103: 153-60.
- Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. 1980. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? *J. Neurol. Sci.* 47: 117-33.
- Galbiati S, Bordon A, Papadimitriou D, Toscano A, Rodolico C, Katsarou *et al.* 2006. New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion. *Pediatr. Neurol.* 34: 177-85.
- Garcia-Lozano JR, Aguilera I, Bautista J, Nuñez-Roldan A. 2000. A new mitochondrial DNA mutation in the tRNA leucine 1 gene (C3275A) in a patient with Leber's hereditary optic neuropathy. *Hum. Mutat.* 15: 120-21.
- Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain.* doi: 10.1093/brain/awr245.
- Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, Lochmüller H *et al.* 2009. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat. Genet.* 41: 654-56.

- Ghezzi D, Arzuffi P, Zordan M, Da Re C, Lamperti C, Benna C *et al.* 2011. Mutations in *TTC19* cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nature Genetic.* 43: 259-63.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. 1990. A mutation in the tRNA(Leu) (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 348: 651-53.
- Götz A, Isohanni P, Pihko H, Paetau A, Herva R, Saarenpää-Heikkilä O *et al.* 2008. Thymidine kinase 2 defects can cause multi-tissue mtDNA depletion syndrome. *Brain.* 131: 2841-50.
- Grigorieff N. 1998. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J. Mol. Biol.* 277: 1033-46.
- Guenebaut V, Schlitt A, Weiss H, Leonard K, Friedrich T. 1998. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* 276: 105-12.
- Guenthard J, Wyler F, Fowler B, Baumgartner R. 1995. Cardiomyopathy in respiratory chain disorders. *Arch. Dis. Child.* 72: 223-26.
- Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N *et al.* 2007. Mitochondrial Disease: A Practical Approach for Primary Care Physicians. *Pediatric.* 120: 1326-33.
- Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N *et al.* 2008. The in depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 94: 16-37.
- Hanchard NA, Shchelochkov OA, Roy A, Wisniewska J, Wang J, Popek EJ *et al.* 2011. Deoxyguanosine kinase deficiency presenting as neonatal hemochromatosis. *Mol. Genet. Metab.* 103: 262-67.
- Hanna MG, Nelson I, Sweeney MG, Cooper JM, Watkins PJ, Morgan-Hughes JA *et al.* 1995. Congenital encephalomyopathy and adult-onset myopathy and diabetes mellitus: different phenotypic associations of a new heteroplasmic mtDNA tRNA glutamic acid mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1026-33.
- Hao HX, Khalimonchuk O, Schradars M, Dephoure N, Bayley JP, Kunst H *et al.* 2009. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science.* 325: 1139-42.
- Haut S, Brivet M, Touati G, Rustin P, Lebon S, Garcia-Cazorla A *et al.* 2003. A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum. Genet.* 113: 118-22.
- Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C *et al.* 2002. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 1152-71.
- Herzer M, Koch J, Prokisch H, Rodenburg R, Rauscher C, Radauer W *et al.* 2010. Leigh disease with brainstem involvement in complex I deficiency due to assembly factor NDUFAF2 defect. *Neuropediatrics.* 41: 30-34.
- Hirano M, Pavlakis SG. 1994. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): current concepts. *J. Child Neurol.* 9: 4-13.
- Hoefs SJ, Dieteren CE, Distelmaier F, Janssen RJ, Epplen A, Swarts HG *et al.* 2008. NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 1306-15.
- Hoefs SJ, Skjeldal OH, Rodenburg RJ, Nedregaard B, van Kaauwen EP, Spiekerkötter U *et al.* 2010. Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Mol. Genet. Metab.* 100:v251-56.
- Hoefs SJ, van Spronsen FJ, Lenssen EW, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, Smeitink JA *et al.* 2011. NDUFA10 mutations cause complex I deficiency in a patient with Leigh disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 19 : 270-74.
- Hofhaus G, Weiss H, Leonard K. 1991. Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J. Mol. Biol.* 221: 1027-43.
- Holmgren D, Wåhlander H, Eriksson BO, Oldfors A, Holme E, Tulinius M. 2003. Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease; clinical course and cardiological findings. *Eur. Heart J.* 24: 280-88.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. 1988. *Nature.* 331: 717-19.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. 1990. A New Mitochondrial Disease Associated with Mitochondrial DNA Heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 428-33.
- Holt IJ. 2009. Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. *Trends in Biochem. Sci.* 34: 358-65.
- Horváth R, Abicht A, Holinski-Feder E, Laner A, Gempel K, Prokisch H *et al.* 2006. Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (Fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 77: 74-76.

- Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D *et al.* 1991. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 939-50.
- Howell N, Elson JL, Chinnery PF, Turnbull DM. 2005. mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders. *Trends Genet.* 21: 583-86.
- Jacobs HT, Hutchin TP, Käppi T, Gillies G, Minkkinen K, Walker J *et al.* 2005. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur. J. Hum. Genet.* 13: 26-33.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. 2006. Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29: 499-515.
- Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. 1996. Random genetic drift in the female germLine explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 14: 146-51.
- Ji YL, Jia XY, Li SQ, Xiao XS, Guo XM, Zhang QJ. 2010. Evaluation of the X-linked modifier loci for Leber hereditary optic neuropathy with the G11778A mutation in Chinese. *Mol. Vis.* 16: 416-24.
- Johannsen DL, Ravussin E. 2009. The role of mitochondria in health and disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9: 780-86.
- Johns D, Neufeld M, Park R. 1992. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1551-57.
- Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans L, van den Brand M, Janssen A, Diepstra H *et al.* 2008. A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *J. Med. Genet.* 45: 129-33.
- Joost K, Rodenburg R, Piirsoo A, van den Heuvel B, Zordania R, Ounap K. A novel mutation in the SCO2 gene in a neonate with early-onset cardioencephalomyopathy. *Pediatr. Neurol.* 42: 227-30.
- Kagawa Y. 2010. ATP synthase: from single molecule to human bioenergetics. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 86: 667-69.
- Karadimas CL, Vu TH, Holve SA, Chronopoulou P, Quinzii C, Johnsen SD *et al.* 2006. Navajo neurohepatopathy is caused by a mutation in the MPV17 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 544-48.
- Kawamata H, Tiranti V, Magrané J, Chinopoulos C, Manfredi G. 2011. adPEO mutations in ANT1 impair ADP-ATP translocation in muscle mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 20: 2964-74.
- Keränen T, Kuusisto H. 2006. NARP syndrome and adult onset generalised seizures. *Epileptic Disord.* 8: 200-03.
- Kirby DM, Thorburn DR. 2008. Approaches to finding the molecular basis of MD. *Twin Res. Hum. Genet.* 11: 395-411.
- Kirino Y, Goto Y, Campos Y, Arenas J, Suzuki T. 2005. Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 7127-32.
- Kisler J, Whittaker RG, McFarland R. 2010. Mitochondrial diseases in childhood: a clinical approach to investigation and management. *Dev. Med. Child. Neurol.* 52: 422-33.
- Koene S, Smeitink J. 2009. Mitochondrial medicine: entering the era of treatment. *J. Intern. Med.* 265: 193-209.
- Koenig MK. Presentation and diagnosis of mitochondrial disorders in children. 2008. *Pediatr. Neurol.* 38: 305-13.
- Kokotas H, Grigoriadou M, Korres GS, Ferekidou E, Papadopoulou E, Neou P *et al.* 2009. The A1555G mitochondrial DNA mutation in Greek patients with non-syndromic, sensorineural hearing loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390: 755-57.
- Kollberg G, Darin N, Benan K, Moslemi AR, Lindal S, Tulinius M *et al.* 2009. A novel homozygous RRM2B missense mutation in association with severe mtDNA depletion. *Neuromuscul. Disord.* 19: 147-50.
- Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M *et al.* 2009. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793: 186-99.
- Kumar M, Tanwar M, Saxena R, Sharma P, Dada R. 2010. Identification of novel mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Mol. Vis.* 16: 782-92.
- Lancaster RD. 2002. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 1-6.
- Laugel V, This-Bernd V, Cormier-Daire V, Speeg-Schatz C, de Saint-Martin A, Fischbach M. 2007. Early-onset ophthalmoplegia in Leigh-like syndrome due to NDUFV1 mutations. *Pediatr. Neurol.* 36: 54-57.
- Leber T. 1871. Ueber hereditäre und congenital-angelegte Sehnervenleiden. *Albrecht von Graefes Archiv.*

- fur Ophthalmologie*. 2: 249-91.
- Lebon S, Minai L, Chretien D, Corcos J, Serre V, Kadhon N *et al*. 2007. A novel mutation of the NDUFS7 gene leads to activation of a cryptic exon and impaired assembly of mitochondrial complex I in a patient with Leigh syndrome. *Mol. Genet. Metab*. 92: 104-08.
- Lebre AS. 2010. Stratégie diagnostique dans les maladies mitochondriales. *Pathol. Biol*. 58: 353-56.
- Leshinsky-Silver E, Lebre AS, Minai L, Saada A, Steffann J, Cohen S *et al*. 2009. NDUFS4 mutations cause Leigh syndrome with predominant brainstem involvement. *Mol. Genet. Metab*. 97: 185-89.
- Leshinsky-Silver E, Lev D, Malinger G, Shapira D, Cohen S, Lerman-Sagie T *et al*. 2010. Leigh disease presenting in utero due to a novel missense mutation in the mitochondrial DNA-ND3. *Mol. Genet. Metab*. 100: 65-70.
- Lévêque M, Marlin S, Jonard L, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P *et al*. 2007. Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip. *Eur. J. Hum. Genet*. 15: 1145-55.
- Levinger L, Mörl M, Florentz C. 2004. Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. 32: 5430-41.
- Limongelli G, Tome-Esteban M, Dejthavaporn C, Rahman S, Hanna MG, Elliott PM. 2010 Prevalence and natural history of heart disease in adults with primary mitochondrial respiratory chain disease. *Eur. J. Heart Fail*. 12: 114-21.
- Lingala HB, Sankarathi, Penagaluru PR. 2009. Role of connexin 26 (GJB2) & mitochondrial small ribosomal RN (mt 12S rRNA) genes in sporadic & aminoglycoside-induced non syndromic hearing impairment. *Indian J. Med. Res*. 130: 369-78.
- Longley MJ, Humble MM, Sharief FS, Copeland WC. 2010. Disease variants of the human mitochondrial DNA helicase encoded by C10orf2 differentially alter protein stability, nucleotide hydrolysis, and helicase activity. *J. Biol. Chem*. 285: 29690-702.
- Longo N, Schrijver I, Vogel H, Pique LM, Cowan TM, Pasquali M *et al*. 2008. Progressive cerebral vascular degeneration with mitochondrial encephalopathy. *Am. J. Med. Genet. A*. 146: 361-67.
- Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CS, Arndt RC, Freund AA, Bruck I *et al*. 2009. MELAS - Clinical features, muscle biopsy and molecular genetics. *Arq. Neuropsiquiatr*. 67: 668-76.
- Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CS, Arndt RC, Silvado CE, Werneck LC. 2011. MERRF: Clinical features, muscle biopsy and molecular genetics in Brazilian patients. *Mitochondrion*. 11: 528-32.
- Lu J, Qian Y, Li Z, Yang A, Zhu Y, Li R *et al*. 2010. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion*. 10: 69-81.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. 1962. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J. Clin. Invest*. 41: 1776-804.
- Ma Y, Fang F, Yang Y, Zou L, Zhang Y, Wang S. 2009. The study of mitochondrial A3243G mutation in different samples. *Mitochondrion*. 9: 139-43.
- Makino M, Horai S, Goto Y, Nonaka I. 2000. Mitochondrial DNA mutations in Leigh syndrome and their phylogenetic implications. *J. Hum. Genet*. 45: 69-75.
- Mao CC, Holt JJ. 2009. Clinical and Molecular Aspects of Diseases of Mitochondrial DNA Instability. *Chang Gung Med. J*. 32: 354-69.
- Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I *et al*. 2008. Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in COX6B1, a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase. *Am. J. Hum. Genet*. 82: 1281-89.
- Matsunaga T. 2009. Value of Genetic Testing in the Otological Approach for Sensorineural Hearing Loss. *Keio. J. Med*. 58: 216-22.
- Mayr JA, Bodamer O, Haack TB, Zimmermann FA, Madignier F, Prokisch H *et al*. 2011. Heterozygous mutation in the X chromosomal NDUFA1 gene in a girl with complex I deficiency. *Mol. Genet. Metab*. 103: 358-61.
- McFarland R, Turnbull DM. 2009. Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *J. Intern. Med*. 265: 210-28.
- McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. 2010. A neurological perspective on mitochondrial disease. *Lancet. Neurol*. 9: 829-40.
- Meas T, Laloï-Michelin M, Virally M, Ambonville C, Kevorkian JP, Guillausseau PJ. 2010. Mitochondrial diabetes: clinical features, diagnosis and management. *Rev. Med. Interne*. 31: 216-21.

- Mezghani N, Mnif M, Kacem M, Mkaouar-Rebai E, Hadj Salem I, Kallel N *et al.* 2011. A whole mitochondrial genome screening in a MELAS patient: a novel mitochondrial tRNA(Val) mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22: 747-52.
- Mitchell AL, Elson JL, Howell N, Taylor RW, Turnbull DM. 2006. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *J. Med. Genet.* 43:175-79.
- Mkaouar-Rebai E, Fendri-Kriaa N, Louhichi N, Tlili A, Triki C, Ghorbel A *et al.* 2010. Whole mitochondrial genome screening in two families with hearing loss: detection of a novel mutation in the 12S rRNA gene. *Biosci. Rep.* 30: 405-11.
- Mkaouar-Rebai E, Kammoun F, Chamkha I, Kammoun N, Hsairi I, Triki C *et al.* 2010. A de novo mutation in the adenosine triphosphatase (ATPase) 8 gene in a patient with mitochondrial disorder. *J. Child. Neurol.* 25:770-75.
- Montoya J, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. 2009. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787: 476–83.
- Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M *et al.* 2003. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 605-10.
- Morán M, Marín-Buera L, Gil-Borlado MC, Rivera H, Blázquez A, Seneca S *et al.* 2010. Cellular Pathophysiological Consequences of BCS1L Mutations in Mitochondrial Complex III Enzyme Deficiency. *Hum. Mutat.* 31: 930-41.
- Moreno-Loshuertos R, Ferrín G, Acín-Pérez R, Gallardo ME, Viscomi C, Pérez-Martos A *et al.* 2011. Evolution Meets Disease: Penetrance and Functional Epistasis of Mitochondrial tRNA Mutations. *PLoS Genet.* 7:e1001379.
- Moslemi AR, Darin N, Tulinius M, Oldfors A, Holme E. 2005. Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome. *Neuropediatrics.* 36: 314-18.
- Nass MM, Nass S. 1963a. Fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J. Cell Biol.* 19: 593–61.
- Nass S, Nass MM. 1963b. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J. Cell Biol.* 19: 613-29.
- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. 1999. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science.* 283: 689-92.
- Nogueira C, Carrozzo R, Vilarinho L, Santorelli FM. 2011. Infantile-onset disorders of mitochondrial replication and protein synthesis. *J. Child. Neurol.* 26: 866-75.
- Nogueira C, Coutinho M, Pereira C, Tessa A, Santorelli FM, Vilarinho L. 2011. Molecular Investigation of Pediatric Portuguese Patients with Sensorineural Hearing Loss. *Genetics Research International.* doi:10.4061/2011/587602.
- Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, Erazo R, Gurgel-Giannetti J, Krishna Sn *et al.* 2006. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol.* 63: 1122-26.
- Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, Mogensen B, Duno M, Shoubridge EA *et al.* 2007 Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 383-87.
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE *et al.* 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. 134: 112-23.
- Pagniez-Mammeri H, Lombes A, Brivet M, Ogier-de Baulny H, Landrieu P, Legrand A *et al.* 2009. Rapid screening for nuclear genes mutations in isolated respiratory chain complex I defects. *Mol. Genet. Metab.* 96: 196-200.
- Papa S, Petruzzell V, Scacco S, Sardanelli AM, Iuso A, Panelli D *et al.* 2009. Pathogenetic mechanisms in hereditary dysfunctions of complex I of the respiratory chain in neurological diseases. *Biochi. Biophys. Acta.* 1787: 502-17.
- Park KP, Kim HS, Kim ES, Park YE, Lee CH, Kim DS. 2011. SLC25A4 and C10ORF2 Mutations in Autosomal Dominant Progressive External Ophthalmoplegia. *J. Clin. Neurol.* 7:25-30.
- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. 1984. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann.*

- Neurol.* 16: 481-88.
- Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E, Pronicki M, Karczmarewicz E, Tylek-Lemanska D, Sykut-Cegielska J. 2009. High prevalence of SURF1 c.845_846delCT mutation in Polish Leigh patients. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 13: 146-53.
- Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ *et al.* 1993. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.* 4: 289-94.
- Procaccio V, Wallace DC. 2004. Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUF58 mutations. *Neurology.* 62: 1899-901.
- Randolph LM, Jackson HA, Wang J, Shimada H, Sanchez-Lara PA, Wong DA *et al.* 2011. Fatal infantile lactic acidosis and a novel homozygous mutation in the SUCLG1 gene: a mitochondrial DNA depletion disorder. *Mol. Genet. Metab.* 102: 149-52.
- Ronchi D, Bordoni A, Cosi A, Rizzuti M, Fassone E, Di Fonzo A *et al.* 2011. Unusual adult-onset Leigh syndrome presentation due to the mitochondrial m.9176T>C mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412: 245-48.
- Ronchi D, Fassone E, Bordoni A, Sciacco M, Lucchini V, Di Fonzo A *et al.* 2011. Two novel mutations in PEO1 (Twinkle) gene associated with chronic external ophthalmoplegia. *J. Neurol. Sci.* 308: 173-16.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science.* 303: 223-26.
- Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. 2010. Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion.* 10: 393-401.
- Rustin P, Rotig A. 2002a. Inborn errors of complex II - Unusual human mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 117-22.
- Saada A, Edvardson S, Rapoport M, Shaag A, Amry K, Miller C *et al.* 2008. C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 32-38.
- Saada A, Vogel RO, Hoefs SJ, van den Brand MA, Wessels HJ, Willems PH *et al.* 2009. Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease. *Am. J. Hum. Genet.* 84: 718-27.
- Saada A, Edvardson S, Shaag A, Chung WK, Segel R, Miller C *et al.* 2011. Combined OXPHOS complex I and IV defect, due to mutated complex I assembly factor C20ORF7. *J. Inherit. Metab. Dis.* doi: 10.1007/s10545-011-9348-y.
- Saneto RP, Naviaux RK. Polymerase gamma disease through the ages. 2010. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16: 163-74.
- Saneto RP, Singh KK. 2010. Illness-induced exacerbation of Leigh syndrome in a patient with the MTATP6 mutation, m. 9185 T>C. *Mitochondrion.* 10: 567-72.
- Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP *et al.* 1997. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 326-28.
- Scaglia F, Wong LJ. 2008. Human mitochondrial transfer RNAs: role of pathogenic mutation in disease. *Muscle Nerve.* 37: 150-71.
- Schaller A, Hahn D, Jackson CB, Kern I, Chardot C, Belli DC *et al.* 2011. Molecular and biochemical characterisation of a novel mutation in POLG associated with Alpers syndrome. *BMC Neurol.* 11:4.
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M, Gilkerson RW. 2010. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Mol. Med.* 16: 268-76.
- Schwartz M, Vissing J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 347: 576-80.
- Shaag A, Saada A, Steinberg A, Navon P, Elpeleg ON. 1997. Mitochondrial encephalomyopathy associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene (A3243T). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 637-39.
- Shaibani A, Shchelochkov OA, Zhang S, Katsonis P, Lichtarge O, Wong LJ *et al.* 2009. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy due to mutations in RRM2B. *Arch. Neurol.* 66: 1028-32.
- Shanske S, Coku J, Lu J, Ganesh J, Krishna S, Tanji K *et al.* 2008. The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases. *Arch. Neurol.* 65: 368-72.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza A, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. 1990. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell.* 61: 931-37.

- Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, DiMauro S. 1992. A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am. J. Hum. Genet.* 51: 1213-17.
- Simon DK, Friedman J, Breakefield XO, Jankovic J, Brin MF, Provias J *et al.* 2003. A heteroplasmic mitochondrial complex I gene mutation in adult-onset dystonia. *Neurogenetics.* 4: 199-205.
- Sissler M, Helm M, Frugier M, Giege R, Florentz C. 2004. Aminoacylation properties of pathology-related human mitochondrial tRNA(Lys) variants. *RNA.* 10: 841-53.
- Spiegel R, Shaag A, Mandel H, Reich D, Penyakov M, Hujeirat Y *et al.* 2009. Mutated NDUF6 is the cause of fatal neonatal lactic acidemia in Caucasus Jews. *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 1200-03.
- Spinazzola A, Zeviani M. 2009. Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *J. Intern. Med.* 265: 174-92.
- Sproule DM, Kaufmann P. 2008. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1142: 133-58.
- Steffann J, Gigarel N, Corcos J, Bonnière M, Encha-Razavi F, Sinico M *et al.* 2007. Stability of the m.8993TRG mtDNA mutation load during human embryofetal development has implications for the feasibility of prenatal diagnosis in NARP syndrome. *J. Med. Genet.* 44: 664-69.
- Stiburek L, Hansikova H, Tesarova M, Cerna L, Zeman J. 2006. Biogenesis of Eukaryotic Cytochrome c Oxidase. *Physiol. Res.* 55: 27-41.
- Stiburek L, Zeman J. 2010. Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797: 1149-58.
- Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D *et al.* 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell.* 121: 1043-57.
- Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul. Disord.* 20: 429-37.
- Suomalainen A. 2011. Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34: 277-82.
- Suzuki T, Nagao A, Suzuki T. 2011. Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine modification in mitochondrial tRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2: 376-86.
- Tang X, Li R, Zheng J, Cai Q, Zhang T, Gong S *et al.* 2010. Maternally inherited hearing loss is associated with the novel mitochondrial tRNA Ser(UCN) 7505T>C mutation in a Han Chinese family. *Mol. Genet. Metab.* 100: 57-64.
- Tay SK, Nesti C, Mancuso M, Schon EA. 2004. Studies of COX16, COX19, and PET191 in Human Cytochrome-c Oxidase Deficiency. *Arch Neurol.* 61: 1935-37.
- Taylor RW, Singh-Kler R, Hayes CM, Smith PE, Turnbull DM. 2001. Progressive mitochondrial disease resulting from a novel missense mutation in the mitochondrial DNA ND3 gene. *Ann. Neurol.* 50: 104-07.
- Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6: 389-402.
- Thajeb P, Dai DF. 2007. Current opinion on the clinical approach to the diagnosis of mitochondrial disease. *Int. J. of Gerontol.* 1: 22-30.
- Thorburn DR, Smeitink J. 2001. Diagnosis of mitochondrial disorders: Clinical and biochemical approach. *J. Inherited. Metab. Dis.* 24: 312-16.
- Thyagarajan D, Shanske S, Vazquez-Memije M, De Vivo D, DiMauro S. 1995. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann. Neurol.* 38: 468-72.
- Thyagarajan D, Bressman S, Bruno C, Przedborski S, Shanske S, Lynch T *et al.* 2000. A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. *Ann. Neurol.* 48: 730-36.
- Tiranti V, Carrara F, Confalonieri P, Mora M, Maffei RM, Lamantea E *et al.* 1999. A novel mutation (8342G->A) in the mitochondrial tRNA(Lys) gene associated with progressive external ophthalmoplegia and myoclonus. *Neuromuscul. Disord.* 9: 66-71.
- Tońska K, Kodroń A, Bartnik E. 2010. Genotype-phenotype correlations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797: 1119-23.
- Tornroth S, Yankovskaya V, Cecchini G, Iwata S. 2002. Purification, crystallisation and preliminary crystallographic studies of succinate: ubiquinone oxidoreductase from Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 171-76.

- Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F *et al.* 1997. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 1107-21.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-ito K *et al.* 1995. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 269: 1069-74.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K *et al.* 1996. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science*. 272: 1136-44.
- Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. 2009. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *BBA - Bioenergetics*. 1797: 113-28.
- Tuppen HA, Hogan VE, He L, Blakely EL, Worgan L, Al-Dosary M *et al.* 2010. The p.M292T NDUFS2 mutation causes complex I-deficient Leigh syndrome in multiple families. *Brain*. 133 : 2952-63.
- Tynismaa H, Sun R, Ahola-Erkkilä S, Almusa H, Pöyhönen R, Korpela M *et al.* 2011. Thymidine kinase 2 mutations in autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. *Hum. Mol. Genet.* doi: 10.1093/hmg/ddr438.
- Ueno H, Nishigaki Y, Kong QP, Fuku N, Kojima S, Iwata N *et al.* 2009. Analysis of mitochondrial DNA variants in Japanese patients with schizophrenia. *Mitochondrion*. 9: 385-93.
- Valayannopoulos V, Haudry C, Serre V, Barth M, Boddaert N, Arnoux JB *et al.* 2010. New SUCLG1 patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria. *Mitochondrion*. 10: 335-41.
- Valente L, Piga D, Lamantea E, Carrara F, Uziel G, Cudia P *et al.* 2009. Identification of novel mutations in five patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1787: 491-501.
- Valnot I, Osmond S, Gigarel N, Mehaye B, Amiel J, Cormier-Daire V *et al.* 2000. Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1104-09.
- Van Goethem G, Mercelis R, Löfgren A, Seneca S, Ceuterick C, Martin JJ *et al.* 2003. Patient homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF. *Neurology*. 61: 1811-13.
- Van Hove JL, Saenz MS, Thomas JA, Gallagher RC, Lovell MA, Fenton LZ *et al.* 2010. Succinyl-CoA ligase deficiency: a mitochondrial hepatoencephalomyopathy. *Pediatr. Res*. 68: 159-64.
- Vu TH, Tanji K, Holve SA, Bonilla E, Sokol RJ, Snyder RD *et al.* 2001. Navajo neurohepatopathy: a mitochondrial DNA depletion syndrome? *Hepatology*. 3: 116-20.
- Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. 2008. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat. Genet.* 40: 1484-88.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM *et al.* 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 242: 1427-30.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 238: 211-30.
- Wallace DC. 2005. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: On the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene*. 354: 169-80.
- Wallace DC. 2007. Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 781-821.
- Wallace DC, Fan W. 2010. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*. 10: 12-31.
- Walker M, Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial diabetes. *Diabetes Med*. 22: 18-20.
- Walter MC, Czermin B, Müller-Ziermann S, Bulst S, Stewart JD, Hudson G *et al.* 2010. Late-onset ptosis and myopathy in a patient with a heterozygous insertion in POLG2. *J. Neurol.* 257: 1517-23.
- Walker UA, Collins S, Byrne E. 1996. Respiratory chain encephalomyopathies: A diagnostic classification. *Eur. Neurol.* 36: 260-67.
- Wang ZG, White PS, Ackerman SH. 2001. Atp11p and Atp12p Are Assembly Factors for the F1-ATPase in Human Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276: 30773-78.
- Wani AA, Ahanger SH, Bapat SA, Rangrez AY, Hingankar N, Suresh CG *et al.* 2007. Analysis of mitochondrial DNA sequences in childhood encephalomyopathies reveals new disease-associated variants. *PLoS One*. 2: e942.
- Wanrooij S, Falkenberg M. 2010. The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 1797: 1378-88.

- Weraarpachai W, Antonicka H, Sasarman F, Seeger J, Schrank B, Kolesar JE *et al.* Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat. Genet.* 41: 833-37.
- Whittaker RG, Schaefer AM, McFarland R, Taylor RW, Walker M, Turnbull DM. 2007. Prevalence and progression of diabetes in mitochondrial disease. *Diabetologia.* 50: 2085-89.
- Wittig I, Schägger H. 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777: 592-98.
- Wolf NI, Smeitink AM. 2002. Mitochondrial disorders: A proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology.* 59:1402-05.
- Wong LJ, Liang MH, Kwon H, Park J, Bai RK, Tan DJ. 2002. Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. *Clin. Chem.* 48: 1901-12.
- Wong LJ, Boles RG. 2005. Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta.* 354: 1-20.
- Wong LJ. 2007. Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes. *Muscle Nerve.* 36: 279-93.
- Wong, LJ. 2010. Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16: 154-62.
- Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L *et al.* 1997. Crystal Structure of the Cytochrome bc1 Complex from Bovine Heart Mitochondria. *Science.* 277: 60-66.
- Yamashita S, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single large-scale mitochondrial DNA deletions. *J. Hum. Genet.* 53: 598-606.
- Yang T, Lam CW, Tsang MW, Tong SF, Kam GY, Chan LY *et al.* 2002. Novel mitochondrial 16S rRNA mutation, 3200T-->C, associated with adult-onset type 2 diabetes. *Chin. Med. J. (Engl).* 115: 753-58.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. 2009. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J. Med. Genet.* 46: 145-58.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. 2011. Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye. Res.* 30: 81-114.
- Zaragoza MV, Brandon MC, Diegoli M, Arbustini E, Wallace DC. 2011. Mitochondrial cardiomyopathies: how to identify candidate pathogenic mutations by mitochondrial DNA sequencing, MITOMASTER and phylogeny. *Eur. J. Hum. Genet.* 19: 200-07.
- Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. 1989. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature.* 339: 309-11.
- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C. 2007. Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biol.* 4: 38-66.
- Zifa E, Theotokis P, Kaminari A, Maridaki H, Leze H, Petsiava E *et al.* 2008. A novel G3337A mitochondrial ND1 mutation related to cardiomyopathy co-segregates with tRNA^{Leu}(CUN) A12308G and tRNA^{Thr} C15946T mutations. *Mitochondrion.* 8: 229-36.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I - Genes nucleares e fenótipos associados

7.1.1 Genes estruturais e de *assembly*

Os fenótipos associados com mutações nos genes nucleares que codificam subunidades proteicas dos complexos enzimáticos da CRM, ou as proteínas acessórias necessárias para um *assembly* correcto (essencial para a conjugação sincronizada dos diferentes polipeptídeos nos complexos) já foram abordados aquando da descrição de cada um dos complexos. Vimos que foram descritas mutações em diversos genes estruturais dos complexos I-IV mas predominantemente nos dois primeiros, bem como nos factores de *assembly* de todos os complexos (Figura 41).

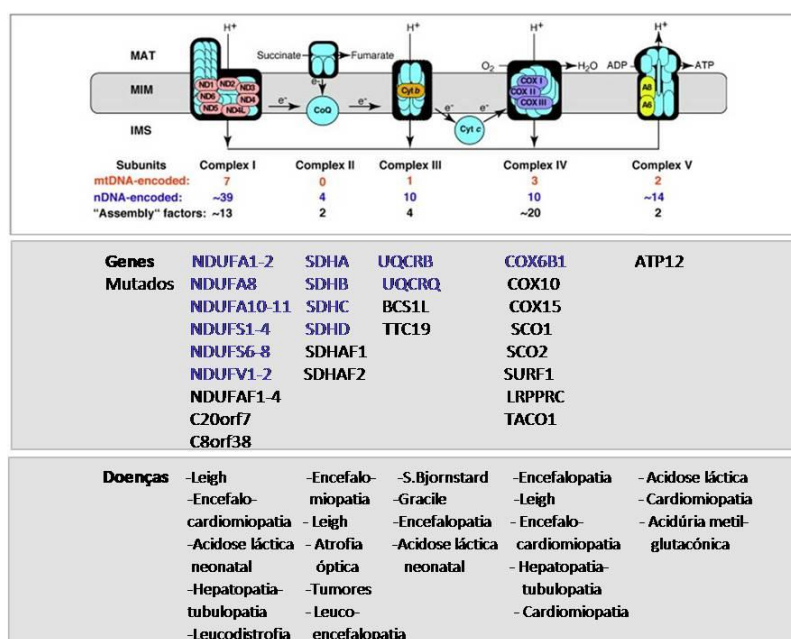


Figura 41 - OXPHOS com indicação dos genes nucleares estruturais e de *assembly* em que foram descritas mutações, e os respectivos fenótipos.

(Adaptado de DiMauro & Schon, 2008)

7.1.2 Genes da replicação e metabolismo do *pool* dos dNTPs

A manutenção do mtDNA requer a actividade concertada de vários factores nucleares que participam na sua replicação, fazendo parte do replissoma ou fornecendo dNTPs (*Deoxyribonucleotide Triphosphates*) à mitocôndria. Uma mutação primária nos genes implicados nestes mecanismos poderá originar alterações secundárias no mtDNA que incluem deleções múltiplas ou uma redução no número de cópias de mtDNA (depleção) (Figura 42).

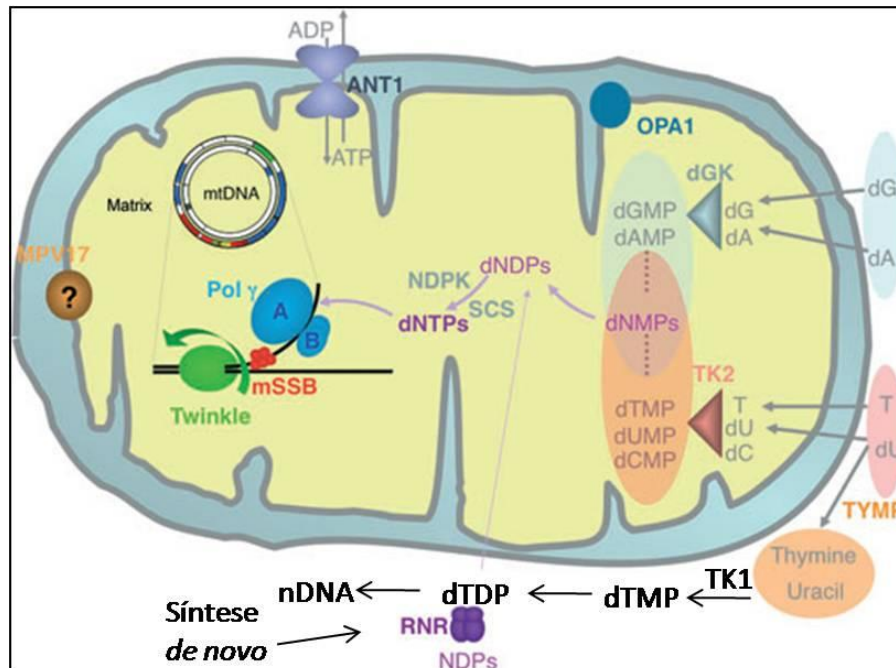


Figura 42 - Metabolismo do pool de dNTPs com as enzimas e genes envolvidos.

(Adaptada de Spinazzola & Zeviani, 2009)

- Replicação

O mtDNA é replicado pela DNA polimerase γ (pol γ A) codificada pelo gene *POLG1* e a sua subunidade acessória (polyB) codificada pelo *POLG2*, a *Twinkle* helicase cujo gene é o *PEO1* constitui outro factor necessário à replicação (Rotig & Poulton, 2009). O gene *POLG1* é composto por um domínio polimerase, uma região de ligação e o domínio exonuclease. O espectro de doenças associadas com mutações no *POLG* é vasto, sendo influenciado por uma conjugação de factores que incluem o genótipo, o *background* genético, efeitos epigenéticos, factores ambientais e a idade de atingimento. A hereditariedade é mendeliana sendo essencialmente recessiva, tendo igualmente sido descritos casos de expressão funcional monoalélica (Cohen & Naviaux, 2010).

Em menos de uma década foram descritas cerca de 150 mutações, estas podem ocorrer: (i) no domínio polimerase, resultando numa redução da actividade catalítica, levando a uma diminuição da síntese de mtDNA ou deleções; (ii) na região de ligação, podendo comprometer a interacção entre o *POLG* e a sua subunidade acessória diminuindo o seu processamento; (iii) no domínio exonuclease, em que a eficácia e o sistema de reparação da replicação serão afectados (Saneto & Naviaux, 2010). As mutações no *POLG1* são agora consideradas como uma das causas mais comuns de CM nas crianças e adultos. Estão associadas com cerca de 30 doenças (Figura 43) das

quais se destaca um grupo heterogêneo de pelo menos seis fenótipos *major*: oftalmoplegia externa progressiva autossômica recessiva ou dominante (arPEO e adPEO, respectivamente); síndrome de Alpers-Huttenlocher (AHS - *Alpers-Huttenlocher Syndrome*); síndrome de miocerebrohepatopatia (MCHS - *Myocerebrohepatopathy Syndrome*); síndrome de epilepsia mioclônica, miopatia e ataxia sensorial (MEMSA - *Myoclonus Epilepsy Myopathy Sensory Ataxia*) e espectro de ataxia e neuropatia (ANS - *Ataxia neuropathy Spectrum*) (Schaller *et al.* 2011).

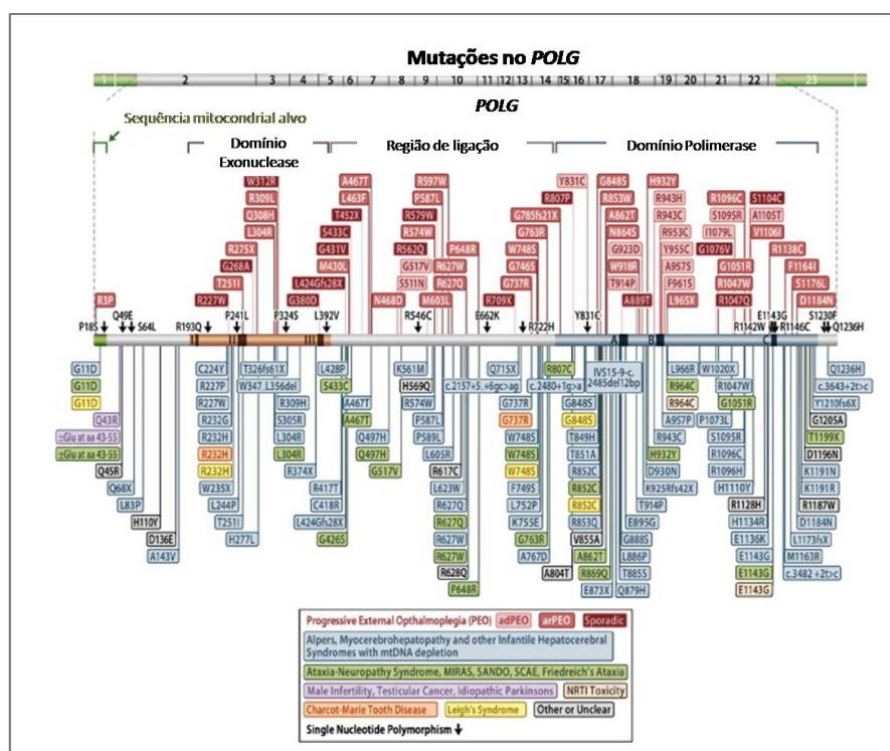


Figura 43 - Gene *POLG* com as mutações descritas e respectivos fenótipos.

(Adaptada de Cohen & Naviaux, 2010)

A helicase do mtDNA, *Twinkle*, codificada pelo gene *PEO1*, funciona como uma hidrolase de nucleotídeos e localiza-se nos nucleoides mitocondriais. A *Twinkle* interage com a subunidade β da polimerase γ e é estimulada pela proteína de ligação ao DNA de cadeia simples para formar uma unidade de replicação do mtDNA. Mais de 30 mutações foram descritas nos exões 1 e 2, sendo estas essencialmente *missense* (Park *et al.* 2011). As mutações recessivas causam síndrome de ataxia espinocerebelar infantil (IOSCA- *Infantile Onset Spinocerebellar Ataxia*), que poderá manifestar-se mais tardiamente com epilepsia, enxaquecas e sintomas psiquiátricos, bem como sob a forma hepatocerebral das síndromes de depleção. A maioria dos casos de atingimento na idade adulta são caracterizados por adPEO, estando associados com deleções múltiplas (Fratte

et al. 2010). Após a avaliação dos casos descritos até à data, Ronchi e colegas apresentaram algumas conclusões: i) as mutações no *PEO1* são mais frequentes nos adultos que nas crianças; ii) os sintomas mais comuns são a PEO e ptose; iii) a idade de atingimento dos pacientes com mutações dominantes é geralmente antes da quinta década; iv) as fibras COX negativas estão normalmente presentes na biópsia muscular mas não em todos os casos; v) a maioria dos casos apresentará delecções mas a sua ausência não exclui a possibilidade de uma mutação neste gene (Ronchi *et al.* 2011).

- Metabolismo do *pool* de dNTPs

Os genes responsáveis pelo metabolismo do *pool* de dNTPs são: o *DGUOK* (*Deoxyguanosine Kinase*), *TK2* (*Thymidine Kinase 2*), *SUCLA2* (*ATP - dependant succinyl CoA synthase*), *SUCLG1* (*GTP - dependant succinyl CoA synthase*), *TYMP* (*Thymidine Phosphorylase*) e *RRM2B* (*p53-induced ribonucleotide reductase B subunit*).

Um aporte contínuo de dNTPs é necessário para a replicação do mtDNA, no entanto, não existe um mecanismo de síntese “de novo” na mitocôndria. Os nucleotídeos são importados a partir do citosol ou resultam da via de *salvage* mitocondrial. Os dNTPs citosólicos são predominantemente sintetizados “de novo” na fase S da mitose pela redutase dos ribonucleotídeos (RNR - *Ribonucleotide Reductase*), assim esta não fornecerá os dNTPs necessários às células pós-mitóticas. Mas os dNTPs são igualmente sintetizados através da via de *salvage*, sendo depois importados para a mitocôndria por transportadores específicos. Esta via envolve enzimas mitocondriais, inicialmente os desoxirribonucleosídeos são fosforilados pelas respectivas quinases (dNK - *deoxyribonucleoside kinase*), seguindo-se dois outros passos de fosforilação pelas quinases dos nucleotídeos monofosfato (NMPK - *Nucleotide Monophosphate Kinase*) e difosfato (NDPK - *Nucleotide Diphosphate Kinase*). As duas principais dNKs são a desoxiguanosina quinase (DGK - *deoxyguanosine kinase*) e a timidina quinase (TK - *Thymidine Kinase*) codificadas pelos genes *DGUOK* e *TK2* respectivamente (Rotig & Poulton, 2009). As mutações no gene *TK2* são a causa mais comum da forma miopática das síndromes de depleção, tendo recentemente sido reportadas num caso com arPEO (Tynismaa *et al.* 2011). Os pacientes com mutações no *DGUOK* apresentam tipicamente um atingimento hepático neonatal, com ou sem envolvimento neurológico, a maioria não sobreviverá para além do ano de vida devido a falência hepática. Alguns casos mostraram uma elevação significativa da tirosina, que apesar de ser um marcador inespecífico de disfunção hepática nas crianças, poderá ter implicações na interpretação dos resultados do rastreio neonatal. É assim aconselhado que os casos rastreados no diagnóstico

precoce em que não foi diagnosticada uma tirosinemia sejam avaliados para uma possível depleção do mtDNA (Dimmock *et al.* 2007).

A succinil-CoA ligase, também conhecida como succinil-CoA sintetase (*SCS - Succinyl Coenzyme A Synthetase*), é uma enzima do ciclo de Krebs que converte a succinil-CoA a succinato e coenzima-A, e o ADP ou GDP a ATP ou GTP respectivamente. Esta enzima da matriz mitocondrial é composta por duas subunidades, a β e a α . A subunidade α é codificada pelo *SUCLG1*, sendo direccionada para ambos os complexos GDP e ADP, enquanto a subunidade β é codificada pelo *SUCLA2* para o substrato ADP e pelo *SUCLG2* para o GDP. O *SUCLG1* está expresso em todos os tecidos mas particularmente no coração, cérebro, rim e fígado. O *SUCLA2* está essencialmente presente no cérebro, músculo esquelético e coração. A SCS é activada pelos níveis de fosfatos mitocondriais e está associada com a quinase dos nucleotídeos difosfato (Van Hove *et al.* 2010). Os sinais característicos dos défices de SCS são uma hipotonia com atingimento precoce, uma síndrome de *Leigh-like* associada com um perfil metabólico característico (elevação do lactato, ácido metilmalónico, e C4-DC na urina) e uma MRI típica. Alguns dos sintomas iniciais são inespecíficos, mas a presença de surdez ou hepatopatia poderão orientar o estudo molecular para o *SUCLA2* e *SUCLG1*, respectivamente (Valayannopoulos *et al.* 2010).

A timidina fosforilase (TP – *Thymidine Phosphorilase*), codificada pelo *TYMP*, é uma enzima do citosol envolvida no catabolismo das pirimidinas promovendo a fosforilação da timidina à timina e desoxirribose-fosfato. As mutações no *TYMP* resultam na acumulação sistémica de timidina e desoxiuridina, a qual leva a um desequilíbrio no pool de desoxinucleotídeos causando depleção do mtDNA, deleções múltiplas ou mutações pontuais no mtDNA que causam a encefalopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE-Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy) (Spinazzola & Zeviani, 2009). A MNGIE é uma doença multissistémica autossómica recessiva, caracterizada por leucoencefalopatia devido a alterações na barreira hemato-encefálica e dismotilidade gastrointestinal severa que leva a caquexia. Os principais sintomas debilitantes desta patologia são as manifestações gastrointestinais, que incluem gastroparesia, diarreias frequentes e pseudo-obstrução intestinal. Manifesta-se entre a primeira e quinta década de vida, mas geralmente, a idade de atingimento é na segunda década. A neuropatia periférica (100%), oftalmoparésia (85%), ptose (65%), surdez (61%), fraqueza muscular (95%), arreflexia (40%), e a acidose láctica (64%) são outros sintomas característicos (Çolak *et al.* 2010).

A redutase dos ribonucleotídeos é o principal factor de regulação do *pool* de nucleotídeos no citoplasma, a sua subunidade R2 induzida pelo p53 e codificada pelo *RRM2B* está expressa nas

células pós-mitóticas, desempenhando provavelmente um papel fundamental na manutenção do *pool* de dNTPs para a síntese de mtDNA. As mutações no *RRM2B* podem causar uma forma neonatal grave do síndrome de depleção encefalomiopática, tendo igualmente sido descrita uma forma de MNGIE e de miopatia mitocondrial nos adultos (Kollberg *et al.* 2009; Shaibani *et al.* 2009).

Outros dois genes, que codificam proteínas localizadas na IMM, causam igualmente depleção ou delecções múltiplas. O *MVP17* cuja função não é conhecida mas que poderá desempenhar um papel na manutenção do mtDNA, e o *SLC25A4* que codifica a ANT1 (*Adenine Nucleotide Translocator, isoform 1*). As mutações no *MVP17* foram descritas na forma infantil da síndrome de depleção hepatocerebral e na neurohepatopatia de Navajo, prevalente na população de Navajo do Sudoeste dos Estados Unidos. O envolvimento hepático aparece cedo no curso da doença e o envolvimento neuromuscular é moderado e mais tardio em contraste com as outras CM multissistémicas em que estes sintomas são pelo contrário mais proeminentes (El-Hattab *et al.* 2010). A ANT1 é uma das três isoformas da ANT, a proteína mais abundante na mitocôndria e que é essencialmente expressa no coração e músculo esquelético, cuja função é a troca entre ADP e ATP. As mutações no *SLC25A4* foram apenas descritas na adPEO (Park *et al.* 2011).

7.1.3 Síndromes de depleção e/ou delecções múltiplas.

As Síndromes de depleção (MSD – *Mitochondrial DNA depletion syndrome*) constituem um grupo heterogéneo de doenças autossómicas recessivas que podem afectar o músculo esquelético, fígado ou cérebro bem como envolver mais do que um deles (Götz *et al.* 2008). Geralmente, as MSD são doenças devastadoras da infância ou adolescência com mau prognóstico. Os fenótipos clínicos são muito diversos podendo sobrepor-se, variando entre encefalohepatopatias infantis até a PEO, parkinsonismo, ataxia e menopausa prematura, antecipando-se que provavelmente mais apresentações estarão por descrever. Os genes envolvidos nestas patologias são responsáveis pela replicação do mtDNA e o metabolismo do *pool* de dNTPs, as mutações num destes genes poderão resultar numa depleção do mtDNA ou delecções múltiplas (Suomalainen & Isohanni, 2010). As MSD de apresentação infantil manifestam-se classicamente sob três formas, a miopática, encefalomiopática e hepatocerebral. No entanto, um número crescente de síndromes associadas com mutações no POLG, que resultam em depleção ou delecções múltiplas, tem sido reportado e também serão abordadas. Foi estabelecido um *cut-off* empírico, em função da idade, de 35-40% para o nível de depleção que resultará numa MSD, mas especialmente nas crianças a redução poderá atingir 1-2%.

7.1.3.1 Forma miopática, encefalomiopática ou hepatocerebral

Na forma miopática, a idade de início da doença ocorre normalmente no primeiro ano de vida, com dificuldades na amamentação, falência no desenvolvimento, hipotonia, fraqueza e ocasionalmente PEO. A morte é geralmente causada pela insuficiência pulmonar e infecções, mas alguns pacientes podem sobreviver até a adolescência. O espectro clínico inclui: (i) uma atrofia muscular espinal tipo 3; (ii) uma síndrome de espinha rígida; (iii) uma fraqueza muscular severa com alterações distróficas marcadas, encefalopatia e convulsões; (iv) um fenótipo miopático moderado sem regressão motora e uma sobrevida mais longa. A biópsia muscular pode apresentar RRFs cujo número pode aumentar com a idade, um déficit de COX difuso, e um déficit enzimático múltiplo. Os níveis de creatina quinase sérica podem estar elevados. Este é um achado laboratorial importante para o diagnóstico, já que a CK aumentada no soro é relativamente incomum nos pacientes com outras miopatias mitocondriais (Galbiati *et al.* 2006; Oskoui *et al.* 2006).

Foram descritas duas formas encefalomiopáticas causadas por um bloqueio da succinil-CoA sintetase. A primeira é caracterizada por um lactato elevado no sangue, um atraso psicomotor severo com hipotonia muscular, uma diminuição na audição e convulsões generalizadas, distonia dos dedos e ptose moderada. A imagem por ressonância magnética cerebral é sugestiva de síndrome de Leigh. Também foi descrita depleção do mtDNA no músculo esquelético. A segunda forma encefalomiopática é extremamente severa e está associada com depleção do mtDNA no músculo, sinais dismórficos, acidose láctica e morte nos primeiros dias de vida. As duas formas estão associadas com uma acidúria metimalônica moderada à severa (Elpeleg *et al.* 2005; Ostergaard *et al.* 2007). Adicionalmente foi reportada outra apresentação neonatal severa que envolve hipotonia, atraso no desenvolvimento e tubulopatia, podendo igualmente ser incluída a síndrome MNGIE quando causada por depleção na adolescência (Kollberg *et al.* 2009).

A forma hepato-cerebral é provavelmente a MSD mais comum. A idade de início dos sintomas situa-se entre o nascimento e os 6 meses de vida; a morte ocorre normalmente no primeiro ano de vida. Os sintomas e sinais mais comuns incluem vômitos persistentes, falência no desenvolvimento, hipotonia e hipoglicemia associados com sintomas neurológicos progressivos. As alterações histológicas na biópsia hepática envolvem uma degeneração das gorduras, uma proliferação do ducto biliar, fibrose e colapso da arquitetura lobular. A histoquímica revela uma redução na COX e a biópsia hepática apresenta um déficit enzimático múltiplo da CRM. Uma variante da forma hepatocerebral do MSD foi descrita na população de Navajo, com uma prevalência de 1:1600 nados vivos, tendo originado o termo neurohepatopatia de Navajo (NNH -

Navajo Neurohepatopathy). Os principais sintomas são hepatopatia, neuropatia periférica, anestesia da córnea e cicatrização, leucoencefalopatia cerebral, falência no desenvolvimento, e acidose metabólica recorrente com infecções intercorrentes (Vu *et al.* 2001; Karadimas *et al.* 2006). Outra forma peculiar da MSD hepatocerebral é a síndrome de Alpers-Huttenlocher (AHS - *Alpers-Huttenlocher syndrome*) que será discutida a seguir.

A forma miopática está associada com mutações no *TK2*; a forma encefalomiopática nos genes *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RMM2B* e *TYMP*; e a forma hepatocerebral nos genes *PEO1*, *POLG1*, *DGUOK* e *MPV17* (Suomalainen & Isohanni, 2010).

7.1.3.2 Síndromes associadas com mutações no POLG

Embora se observe um espectro de sintomas nas doenças associadas a mutações no *POLG1*, existem semelhanças nos fenótipos que permitem em parte classificá-las. Foram inicialmente recomendadas três categorias: Alpers-Huttenlocher, síndrome de ataxia recessiva mitocondrial (MIRAS), espectro de ataxia e neuropatia (ANS) e adPEO/arPEO. No entanto a categoria MIRAS pode ser confusa, podendo ser subdividido em função de algumas particularidades fenotípicas: (i) uma apresentação infantil distinta da síndrome de Alpers-Huttenlocher, com encefalopatia, atraso de desenvolvimento, miopatia e hipotonia mas sem epilepsia como principal sintoma constituirá a síndrome de miocerebrohepatopatia (MCHS) (ii) o grupo de pacientes com mioclonias, epilepsia, hipotonia, miopatia e ataxia sensorial mas sem PEO será incluído na MEMSA e, (iii) os pacientes que manifestam predominantemente ataxia e neuropatia sem epilepsia e miopatia proeminentes no espectro de ataxia e neuropatia (ANS) (Saneto & Naviaux, 2010).

- adPEO oftalmoplegia externa progressiva dominante; arPEO - oftalmoplegia externa progressiva autossômica recessiva;

A oftalmoplegia externa progressiva autossômica dominante (adPEO - *autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia*) caracteriza-se por uma acumulação de deleções múltiplas em tecidos pós-mitóticos. As características típicas da adPEO são atingimento na idade adulta, fraqueza muscular progressiva dos músculos extraoculares e proximais dos membros, com ptose palpebral bilateral e uma limitação grave dos movimentos oculares. Adicionalmente, outros sintomas podem estar presentes, variando entre as famílias, e incluem ataxia, surdez neurosensorial, cataratas, hipogonadismo, parkinsonismo e anomalias psiquiátricas que consistem em depressão severa e uma personalidade esquiva. A disfagia, disfonia, fraqueza dos músculos faciais e neuropatia periférica poderão ser os principais sintomas nalgumas famílias. A hiperlactacidemia plasmática poderá ser detectada em pacientes severamente afectados. O músculo esquelético pode apresentar RRFs, uma acumulação subsarcolémica de mitocôndrias

anormais e uma redução moderada das actividades das enzimas da CRM, dependendo da fase no curso da doença em que é feita a colheita (Spinazzola & Zeviani, 2009). As delecções múltiplas são secundárias a alterações nos genes *SLC25A4*, *PEO1* ou *POLG1* (Finsterer, 2009).

A oftalmoplegia externa progressiva autossómica recessiva (arPEO - *autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia*) é tipicamente caracterizada por oftalmoplegia, aparecendo essencialmente na idade adulta. Outros sintomas incluem ataxia, neuropatia, disartria e miopatia abrangendo igualmente a síndrome SANDO. É essencialmente causada por mutações no *POLG1* (Saneto & Naviaux, 2010).

- AHS - Síndrome de Alpers-Huttenlocher

A síndrome de Alpers-Huttenlocher é uma doença autossómica recessiva caracterizada por atraso de desenvolvimento psicomotor, convulsões contínuas (*epilepsia partialis continua*) e falência hepática de apresentação neonatal ou na infância. A MRI mostra alterações nos gânglios da base e tálamo, e *pachygyria* parcial. Os pacientes apresentam frequentemente um défice múltiplo dos complexos da cadeia respiratória e depleção no fígado, mas estes poderão estar normais no músculo esquelético. Cerca de 40 mutações foram descritas no *POLG1*, as mais comuns são a A467T e a W748S, em homozigotia ou heterozigotia composta com outras mutações (Nogueira *et al.* 2011).

- MCHS - Síndrome de miocerebrohepatopatia

A apresentação é neonatal e geralmente com morte precoce. Os sintomas primários são encefalopatia, atraso de desenvolvimento, miopatia, hipotonia central, e disfunção hepática. A falência no desenvolvimento e dismotilidade gastrointestinal são sintomas presentes noutras CM associadas com mutações no *POLG1*. A dismotilidade manifesta-se geralmente mais cedo nesta apresentação. Apesar das convulsões e mioclonias poderem estar presentes, estas não constituem os principais sintomas estando ausentes na maioria dos doentes. A MRI é usualmente normal podendo no entanto mostrar uma atrofia generalizada ou alterações na substância branca. O que distingue esta síndrome da AHS são os achados hepáticos e uma miopatia mais severa. Poderão ser observados sintomas adicionais que incluem convulsões, neuropatia, disfunção renal e surdez neurosensorial (Saneto & Naviaux, 2010).

- MEMSA - Síndrome de epilepsia mioclónica, miopatia, e ataxia sensorial

Esta síndrome tem como sintomas mais proeminentes a epilepsia, miopatia e ataxia, sem oftalmoplegia. A primeira descrição referia a semelhança com a MERRF, mas sem RRFs a acompanhar a miopatia. A idade de atingimento é tipicamente no final da primeira década de vida. A ausência de PEO e a mioaptia marcada podem permitir distinguir esta síndrome da maioria

dos outros fenótipos (Van Goethem *et al.* 2003). De realçar que esta categoria inclui pacientes previamente classificados com a MIRAS e ataxia espinocerebelar com epilepsia (SCAE-*spinocerebellar ataxia with epilepsy*), apesar de a miopatia raramente ser a apresentação primária nestas síndromes (Cohen & Naviaux, 2010).

- ANS - Espectro de ataxia e neuropatia

O espectro de doenças com ataxia e neuropatia, anteriormente denominado de SANDO, envolve várias síndromes que incluem ataxia, neuropatia, disfunção bulbar e PEO mas sem miopatia. A idade média de atingimento é de 17 anos. Esta categoria inclui igualmente os pacientes com MIRAS e SCAE. O que distingue este fenótipo do MEMSA é a presença de PEO sem uma miopatia proeminente. Uma encefalopatia epiléptica é frequentemente observada, embora seja semelhante a da AHS tende a ter uma progressão mais lenta e moderada. Outros sintomas incluem mioclonias, cegueira, surdez e uma disfunção hepática moderada (Cohen & Naviaux, 2010).

7.2 ANEXO II – Soluções para *Southern-Blotting*

Solução	Reagentes	Quantidade	Observações
TAE 40 x (Tampão tris- acetato-EDTA)	Tris	193,6 g	
	Acetato de sódio	13,6 g	
	Na ₂ EDTA	7,45 g	
	H ₂ O	~800 mL	
	CH ₃ COOH	45 mL	
	HCl qbp	pH=8	
	H ₂ O qbp	1000 mL	
Solução de desnaturação	NaCl	87,65 g	
	NaOH	20,00 g	
	H ₂ O qbp	1000 mL	
Solução de neutralização	Tris	175,32 g	
	NaCl	60,54 g	
	H ₂ O	~800 mL	
	HCl qbp	pH = 7,5	
	H ₂ O qbp	1000 mL	
Tampão de pré- hibridização	<i>Hybridization buffer</i>	30 mL	Agitar 2 horas. Misturar o <i>blocking reagent</i> muito cuidadosamente. Vf = 30 mL
	NaCl	0,876 g	
	<i>Blocking reagent</i>	1,2 g	

Solução	Reagentes	Quantidade	Observações
Tampão de lavagem 1	Ureia	60 g	Pesar ureia para gobelé de 500 mL, adicionar aprox. 400 mL de ddH ₂ O. Adicionar o resto e deixar dissolver em agitação. Vf = 500 mL. 1 semana – 4 °C.
	SDS	0,5 g	
	NaH ₂ PO ₄ 0,5 M pH = 7.0	50 mL	
	NaCl	4,2 g	
	MgCl ₂ 1M	0,5 mL	
	Blocking reagent	1 g	
	H ₂ O qbp	500 mL	
Tampão de lavagem 2 (Working dilution)	Solução stock 20 x	20 mL	Fazer directamente na proveta. Vf = 400 mL
	ddH ₂ O	380 mL	
	MgCl ₂	0,8 mL	
Tampão de lavagem 2 (Stock 20 x)	Tris base	30,25 g	Armazenar em tubos de 10 mL. -20°C até 4 meses.
	NaCl	29,22 g	
	ddH ₂ O qbp	pH = 10 250 mL	
NaH₂PO₄ 0,5 M	NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	19,5 g	Dissolver bem. Vf = 200 mL
	NaOH	pH = 7.0	
	ddH ₂ O qbp	200 mL	
MgCl₂ 1M	MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,952 g	Dissolver bem. Vf = 10 mL
	ddH ₂ O qpb	10 mL	
	NaCl	175,32 g	
SSC 20 x	Citrato de sódio . 2 H₂O	88,23 g	161-0755 (BioRad)
	HCl	pH = 7.0	
	ddH₂O qpb	1000 mL	

7.3 ANEXO III – Tabelas dos genes nucleares

Tabela 10 – Genes nucleares estruturais com mutações patogénicas descritas e respectivos fenótipos.

Gene	Complexo	Nº mutações	Clínica	Referências
NDUFS1	Complexo I	13	LS; leucoencefalopatia	Hoefs <i>et al.</i> 2010 Ferreira <i>et al.</i> 2011
NDUFS2	Complexo I	11	LS ou LS-like; encefalocardiomiopatia	Tuppen <i>et al.</i> 2010
NDUFS3	Complexo I	3	LS; encefalopatia	Pagniez-Mammeri <i>et al.</i> 2009
NDUFS4	Complexo I	9	LS	Leshinsky-Silver <i>et al.</i> 2009 Calvo <i>et al.</i> 2010
NDUFS6	Complexo I	3	Acidose láctica neonatal	Spiegel <i>et al.</i> 2009
NDUFS7	Complexo I	4	LS	Lebon <i>et al.</i> 2007
NDUFS8	Complexo I	7	LS	Procaccio & Wallace, 2004 Calvo <i>et al.</i> 2010
NDUFA1	Complexo I	4	LS-like; encefalomiopatia moderada	Mayr <i>et al.</i> 2011
NDUFA2	Complexo I	1	LS	Hoefs <i>et al.</i> 2008
NDUFA8	Complexo I	1	Encefalomiopatia	Bugiani <i>et al.</i> 2004
NDUFA10	Complexo I	2	LS	Hoefs <i>et al.</i> 2011
NDUFA11	Complexo I	1	Encefalocardiomiopatia; acidose láctica neonatal	Berger <i>et al.</i> 2008
NDUFV1	Complexo I	13	LS-like; leucoencefalopatia	Laugel <i>et al.</i> 2007 Ferreira <i>et al.</i> 2011
NDUFV2	Complexo I	1	Cardiomiopatia	Bénit <i>et al.</i> 2003
SDHA	Complexo II	8	LS; atrofia óptica, ataxia e miopatia	Horváth <i>et al.</i> 2006
UQCRB	Complexo III	1	Hipoglicemia e acidose láctica	Haut <i>et al.</i> 2003
UQCRR	Complexo III	1	ADPM severo, sinais piramidais	Barel <i>et al.</i> 2008
COX6B1	Complexo IV	1	Encefalomiopatia	Massa <i>et al.</i> 2008

Tabela 11 – Genes de *assembly* com mutações patogénicas descritas e respectivos fenótipos.

Gene	Complexo	Nº mutações	Clínica	Referências
NDUFAF1	Complexo I	2	Cardioencefalomiopatia	Dunning <i>et al.</i> 2007
NDUFAF2	Complexo I	7	LS; leucoencefalopatia	Calvo <i>et al.</i> 2010 Herzer <i>et al.</i> 2010
NDUFAF3	Complexo I	3	Acidose láctica neonatal	Saada <i>et al.</i> 2009
NDUFAF4	Complexo I	1	Encefalomiopatia; cardiomiopatia	Saada <i>et al.</i> 2008
C20orf7	Complexo I	4	LS	Calvo <i>et al.</i> 2010 Saada <i>et al.</i> 2011
C8orf38	Complexo I	2	LS	Pagliarini <i>et al.</i> 2008 Calvo <i>et al.</i> 2010
SDHAF1	Complexo II	2	Leucoencefalopatia	Ghezzi <i>et al.</i> 2009
BCS1L	Complexo III	23	Síndrome de Bjornstad; síndrome de GRACILE; encefalopatia	Morán <i>et al.</i> 2010
TTC19	Complexo III	2	Encefalopatia	Ghezzi <i>et al.</i> 2011
Surf1	Complexo IV	61	LS	Piekutowska-Abramczuk <i>et al.</i> 2009

Gene	Complexo	Nº mutações	Clínica	Referências
COX10	Complexo IV	6	LS; leucodistrofia; cardiomiopatia hipertrófica; tubulopatia	Coenen <i>et al.</i> 2004
COX15	Complexo IV	4	LS; cardiomiopatia hipertrófica	Bugiani <i>et al.</i> 2005
LRPPRC	Complexo IV	2	LS Franco Canadiana	Mootha <i>et al.</i> 2003
SCO1	Complexo IV	2	Hepatopatia; acidose metabólica; cardiomiopatia hipertrófica; encefalopatia	Valnot <i>et al.</i> 2001
SCO2	Complexo IV	15	Cardiomiopatia hipertrófica; encefalopatia	Joost <i>et al.</i> 2010
ATP12	Complexo V	1	Acidose láctica; sinais dismórficos; acidúria metilglutacônica	De Meirleir <i>et al.</i> 2004

Tabela 12 – Genes do metabolismo do *pool* de dNTPs com mutações patogênicas descritas e respectivos fenótipos.

Gene	Nº de mutações	Idade de atingimento	Principais sintomas e sinais	Síndromes específicas	Referências
POLG1	163	Qualquer idade	PEO; ataxia; neuropatia; epilepsia; miopatia; encefalopatia; hepatopatia	MSD - Hepatocerebral /Alpers MCHS; MEMSA; ANS	Cohen & Naviaux, 2010 Saneto & Naviaux, 2010
POLG2	10		Ptose; intolerância ao exercício; miopatia	adPEO	Walter <i>et al.</i> 2010
PEO1	44	Infância	adPEO; ptose; ataxia; encefalopatia; hepatopatia	MSD - Hepatocerebral IOSCA	Ronchi <i>et al.</i> 2011 Longley <i>et al.</i> 2010
TK2	31	Infância; adolescência	Fraqueza muscular severa; miopatia; encefalomiopatia;; arPEO <i>CK aumentada</i>	MSD - Miopática SMA I-like	Götz <i>et al.</i> 2008 Tyynismaa <i>et al.</i> 2011
DGUOK	49	Neonatal; infância	Hepatopatia com ou sem nistagmo; distonia; hipotonia; <i>Tirosina elevada</i>	MSD - Hepatocerebral	Hanchard <i>et al.</i> 2011 Dimmock <i>et al.</i> 2008
SUCLA2	7	Infância; adolescência	Fraqueza muscular; hipotonia; acidose láctica; encefalomiopatia; distonia; surdez <i>Acidúria metilmalônica</i>	MSD - Encefalomiopática LS - <i>like</i>	Van Hove <i>et al.</i> 2010
SUCLG1	13	Neonatal; infância	Acidose láctica; hipotonia; hepatomegalia <i>Acidúria metilmalônica</i>	MSD - Encefalomiopática	Randolph <i>et al.</i> 2011
RRM2B	31	Infância	Acidose láctica; encefalomiopatia com ou sem <i>tubulopatia; déficit severo do CIV</i>	MSD - Encefalomiopática MNGIE-like	Kollberg <i>et al.</i> 2009 Shaibani <i>et al.</i> 2009
TYMP	58	Adolescência	PEO; ptose; neuropatia periférica; leucoencefalopatia; <i>dismotilidade gástrica; caquexia</i> <i>Timidina elevada</i>	MNGIE MSD - Encefalomiopática	Garone <i>et al.</i> 2011
ANT	6	Adulta	ptose; intolerância ao exercício; fraqueza muscular;	adPEO	Kawamata <i>et al.</i> 2011 Park <i>et al.</i> 2011
MPV17	15	Neonatal; infância, adolescência	Hepatopatia; hipoglicemia; sintomas neurológicos	MSD - Hepatocerebral Neurohepatopatia de Navajo	El-Hattab <i>et al.</i> 2010